

孕期炎症刺激对子代大鼠血脂水平的影响

余世云, 刘雅, 苏敏
(第三军医大学药理学系药物研究所暨药剂学教研室, 重庆市 400038)

[关键词] 孕期; 炎症; 血脂; 线粒体膜电位
[摘要] 目的 研究孕期炎症刺激对子代大鼠血脂水平的影响。方法 8只SD孕鼠随机分为对照组和脂多糖刺激组,分别在孕第8、10、12天腹腔注射生理盐水或脂多糖(0.79 mg/kg)。子代出生1天及每周测体重;检测8周龄雄性仔鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)水平;组织切片观察子代肝脏病理形态学变化;透射电镜观察肝、胸主动脉超微结构;免疫荧光检测仔鼠肝脏8-OHdG表达情况;TMRE染色检测线粒体膜电位。结果 与对照组子代相比,脂多糖刺激组子代1天、1周龄体重下降($P<0.01$),而后体重显著增加($P<0.01$)。脂多糖刺激组子代8周龄外周血TG、TC、LDL及AST水平与对照组子代相比显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);肝脏病理改变明显,线粒体结构显著损伤,8-OHdG表达增多,肝脏线粒体膜电位较对照组子代明显降低($P<0.01$);胸主动脉表现出内皮脱落、平滑肌细胞迁移为特征的损伤。结论 孕期炎症刺激导致子代线粒体损伤,可能与脂质代谢障碍并最终导致动脉粥样硬化发生相关。
[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Effect of Maternal LPS Exposure During Pregnancy on Blood Lipids in Offspring Rats

YU Shi-Yun, LIU Ya, and SU Min
(Institute of Materia Medica and Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Pregnancy; Inflammation; Blood Lipids; Mitochondrial Membrane Potential
[ABSTRACT] Aim To explore the role of prenatal exposure to lipopolysaccharides (LPS) on blood lipids in offspring rats. Methods Eight pregnant rats were randomly divided into control group and LPS group. The rats in these groups were intraperitoneally administered with vehicle or LPS 0.79 mg/kg on the 8th, 10th and 12th days, respectively. Liver histopathological alteration was observed by hematoxylin-eosin staining and transmission electron microscopy, 8-OHdG expression was determined by confocal laser-scanning microscope and mitochondrial potential was detected by microplate reader in 8-week-old offsprings. Simultaneously, the body weight was measured in offsprings weekly and at day 1. Results By comparison of those offsprings in control group, body weight of offspring rats in 1 day and 1 week were both significantly decreased ($P<0.01$). Whereafter, the body weight of offsprings in LPS group were increased obviously from 2nd week to 8th week ($P<0.01$). Compared with offsprings from control group, there were dramatic increases in the serum level of TG, TC, LDL and AST ($P<0.05$ or $P<0.01$). In 8-week-old LPS offsprings, the liver exhibited significant lesions, in particular mitochondrial pathological alterations. The functional analysis of mitochondria suggested the expression of 8-OHdG increased obviously, and the mitochondrial potential decreased significantly in offsprings of LPS group ($P<0.01$). Furthermore, the thoracic aortas exhibited lesions, including impaired endothelial cells, and migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. Conclusion Our results indicate that maternal LPS exposure during pregnancy leads to mitochondrial dysfunction in offspring that predispose to disorder of blood lipids and even atherosclerosis in adult.

心血管疾病由于高发病率、高致残率和高死亡率 率严重威胁人类的生存质量和期望寿命。动脉粥

样硬化(atherosclerosis, As)是众多心血管疾病的共同病理基础和关键环节。多项大型随机对照研究显示,在广泛开展一级、二级预防的情况下,动脉粥样硬化性心血管疾病仍是全球最常见的死因,修正生活方式仅能带来 As 发病率的小幅下降^[1-2]。因此,亟待从全新角度探索 As 潜在的致病机制,寻找新的防治策略。本课题组前期研究发现,在大鼠孕期给予炎症刺激剂脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),子代大鼠正常喂养 12 周龄后表现出早期 As 的典型病理变化^[3]。为此,本研究拟通过观察母体孕期炎症刺激对子代大鼠血脂水平的影响,进一步探讨孕期炎症刺激子代 As 发生的致病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 SD 孕鼠购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。LPS、TMRE 及 DAPI 购自美国 Sigma 公司,4%多聚甲醛购自武汉 Boster 公司,8-OHdG 抗体购自 Santa Cruz 公司。石蜡切片机(Shandon 公司),E-100 正置显微镜(Nikon 公司),激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss 公司),透射电子显微镜(Philips 公司),多功能酶标仪(Thermo 公司)。

1.2 实验动物

8 只孕鼠随机分为对照组、LPS 刺激组,正常喂养,自由饮食。分别在孕第 8、10、12 天腹腔注射 0.5 mL 生理盐水或 LPS(0.79 mg/kg)。仔鼠出生 1 天及每周固定时间测体重。各组子代大鼠 4 周龄时断乳,雌雄分笼并均予以正常饲料喂养。8 周龄时,各组随机选取 6 只雄性仔鼠进行后续实验。

1.3 血脂和肝功能检测

禁食 12 h 后各组仔鼠乙醚麻醉取血清,利用生化检测仪测定甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平。

1.4 HE 染色观察子代大鼠肝脏组织形态

取各组子代大鼠肝脏组织切成 2 mm×1 mm×1 mm 小块,浸入 4%多聚甲醛中固定过夜,使用 50%、70%、80%、100%乙醇梯度脱水后置入二甲苯中通透,将已经透明的组织置于熔化的石蜡中包埋,将石蜡包埋组织切成 5~8 μm 厚小块后贴于载玻片上,脱蜡染色后再用无水乙醇和二甲苯进行脱水透

明,树脂封片,光学显微镜下观察病理形态学改变。

1.5 透射电镜观察大鼠胸主动脉、肝脏显微结构

分别取肝脏组织、主动脉弓段于 2.5%戊二醛中切成 1 mm×1 mm×1 mm 小块,固定过夜,用 0.1 mol/L PBS 冲洗数次,再用 1%锇酸固定 2 h,用乙醇梯度脱水后,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,枸橼酸铅和醋酸铅染色,透射电镜观察显微结构。

1.6 肝脏 8-OHdG 免疫荧光染色

8-OHdG 是目前公认的 DNA 氧化损伤的标记物,镜下 8-OHdG 阳性细胞呈红色荧光,DAPI 作为细胞核染料,呈现蓝色荧光。因此 8-OHdG⁺/DAPI⁻即为细胞线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)氧化损伤的标记物^[4]。取肝组织 OCT 包埋,冰冻切片,固定,封闭、一抗(8-OHdG, 1:100)孵育、CY5 二抗(1:400)孵育、DAPI 工作液染核,封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.7 子代大鼠肝脏线粒体膜电位检测

取各组子鼠肝脏组织 5 mg,用 2 mL 1 g/L 胶原蛋白酶 IV 消化后制备肝细胞悬液,600 nmol/L TMRE 染色,置 37℃孵箱 20 min,多功能酶标仪检测线粒体荧光强度。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子代大鼠体重变化

LPS 刺激组子代大鼠在出生 1 天及 1 周龄时体重明显低于对照组子代大鼠($P < 0.01$),子代大鼠 2 周龄到 8 周龄时体重持续高于对照组($P < 0.01$;表 1)。

2.2 孕期 LPS 刺激对 8 周龄子代大鼠血脂水平的影响

孕期炎症刺激子代大鼠 8 周龄时外周血中 TC、TG、LDL 含量高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HDL 含量无显著变化(表 2)。

2.3 孕期 LPS 刺激对 8 周龄子代大鼠 ALT、AST 的影响

与对照组比较,孕期炎症刺激子代大鼠 8 周龄时 AST 水平显著升高($P < 0.05$),ALT 水平无明显改变(表 3)。

2.4 孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠肝脏组织学改变

光镜下,对照组子代肝组织肝小叶结构清楚,

肝细胞正常,无肝细胞肿胀和脂肪变性、坏死,肝内及汇管区无炎性细胞浸润和纤维化,胞浆内未见脂滴。LPS 刺激组子代肝小叶结构紊乱,肝细胞体积肿大,有脂肪空泡形成,肝内以及汇管区轻微炎性细胞浸润(图 1)。

表 1. 孕期炎症刺激对子代大鼠体重的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$, g)
Table 1. Effect of prenatal LPS exposure on weight in offspring rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$, g)

时相点	对照组	LPS 刺激组
1 天	7.43±0.15	6.74±0.13 ^a
1 周	13.264±2.581	10.17±3.98 ^a
2 周	19.51±2.76	24.66±2.14 ^a
3 周	30.88±5.02	38.33±1.98 ^a
4 周	35.86±8.43	57.93±9.88 ^a
5 周	43.25±8.70	83.14±11.91 ^a
6 周	57.26±9.82	107.06±14.47 ^a
7 周	85.54±11.21	145.15±20.71 ^a
8 周	114.74±26.86	193.44±24.56 ^a

a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

表 2. 孕期炎症刺激对子代大鼠血脂水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$, mmol/L)
Table 2. Effect of prenatal LPS exposure on blood lipids in offspring rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$, mmol/L)

项目	对照组	LPS 刺激组
TC	1.24±0.24	1.66±0.38 ^a
TG	0.38±0.09	0.64±0.10 ^b
HDL	0.93±0.18	0.90±0.24
LDL	0.43±0.11	0.60±0.14 ^a

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

表 3. 孕期炎症刺激对子代大鼠 AST、ALT 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$, mmol/L)
Table 3. Effect of prenatal LPS exposure on AST and ALT in offspring rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$, mmol/L)

项目	对照组	LPS 刺激组
ALT	25.61±7.23	26.04±4.00
AST	73.53±17.05	99.22±17.22 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

2.5 孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠肝脏超微结构改变

对照组子代肝脏超微结构未见异常,线粒体呈椭圆形双层膜结构,内外膜完整,嵴排列规则有序,

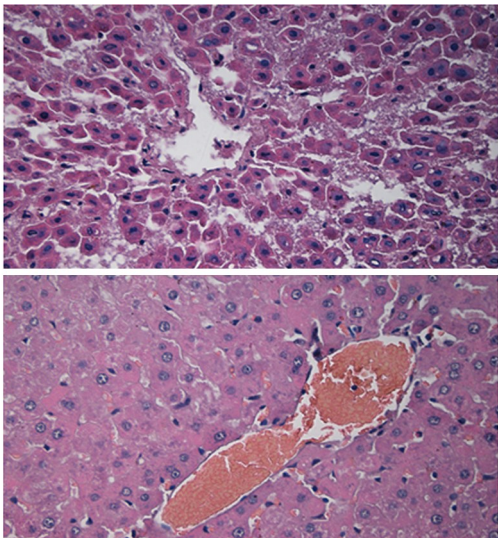


图 1. 子代大鼠肝脏病理学改变(HE 染色,400×) 上图为对照组,下图为 LPS 刺激组。

Figure 1. Liver histopathologicalalterations in offspring rats (HE staining,400×)

基本无空泡及破裂。LPS 刺激子代大鼠 8 周龄时,肝脏线粒体由正常的长丝状变短、呈球形或不规则现状,大部分出现肿胀,线粒体嵴排列紊乱,许多嵴断裂甚至溶解,严重者整个线粒体空泡化(图 2)。

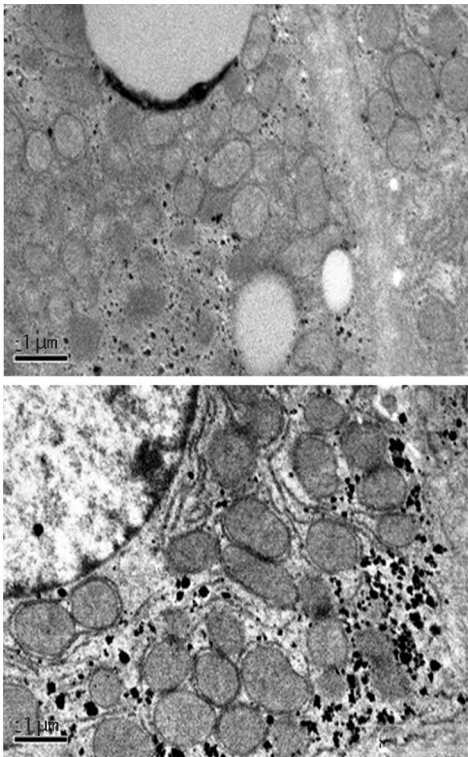


图 2. 子代大鼠肝脏超微结构 上图为对照组,下图为 LPS 刺激组。

Figure 2. Transmission electron micrographs of liver in offspring rats

2.6 孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠肝脏 8-OHdG 免疫荧光染色情况

与对照组相比,LPS 刺激组子代大鼠 8 周龄时 8-OHdG⁺/DAPI⁻ 荧光的数量及强度显著增加(图 3)。

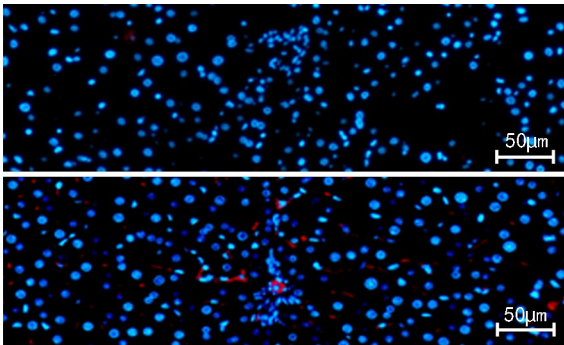


图 3. 子代大鼠肝脏 8-OHdG⁺/DAPI⁻ 标记 上图为对照组,下图为 LPS 刺激组。

Figure 3. Immunolabeling of 8-OHdG⁺/DAPI⁻ in the liver in offspring rats

2.7 孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠肝脏线粒体膜电位改变

与对照组相比,孕期 LPS 刺激组子代大鼠 8 周龄时肝脏组织线粒体膜电位显著降低($P<0.01$;表 4)。

表 4. 孕期炎症刺激对子代大鼠肝脏线粒体膜电位的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4. Effect of prenatal LPS exposure on liver mitochondrial potential in offspring rats($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分 组	线粒体膜电位
对照组	237.91±7.32
LPS 刺激组	208.67±9.13 ^a

a 为 $P<0.01$,与对照组比较。

2.8 孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠胸主动脉超微结构改变

对照组子代大鼠胸主动脉内皮层未受损,内皮细胞形态完整,内弹力膜未见断裂,平滑肌层细胞排列整齐,内弹力膜及胶原纤维未受损;LPS 刺激组子代大鼠胸主动脉内皮层受损,内皮细胞见大量破裂,内弹力膜断裂,平滑肌层细胞排列相对紊乱,胞核形态不规则,平滑肌细胞明显向内皮层迁移(图 4)。

3 讨 论

临床研究表明 As 的前驱表现在胚胎发育过程

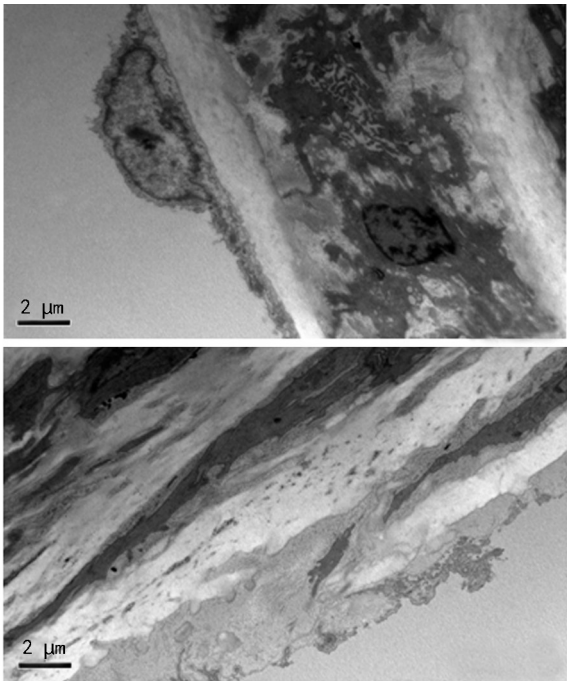


图 4. 子代大鼠胸主动脉超微结构 上图为对照组,下图为 LPS 刺激组。

Figure 4. Transmission electron micrographs of thoracic aortas in offspring rats

中已经出现^[5],大量的流行病学调查及实验室研究证实,子宫内不良环境的刺激,例如营养不良、暴露于乙醇、母亲高脂血症等,均会加速成年后 As 的发生和发展^[6-8]。我室前期研究观察到孕期 LPS 刺激子代新生儿期即有主动脉管腔不规则、内皮细胞脱落,随着周龄增加,血管损伤逐渐加重,动脉壁厚度、硬度均显著增加,表现出早期 As 的典型病理变化,以及以血管收缩反应性显著增高为特征的血管功能失调^[3]。同时显示,孕期炎症刺激子代动物主动脉白细胞介素 1 β (interleukine-1 β , IL-1 β)、IL-18、细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等炎症因子表达明显增加,同时全身炎症反应性增高^[9]。因此,孕期炎症刺激导致子代血管组织炎症,异常激活的炎症信号改变了内皮细胞、平滑肌细胞的生物学特性,同时从循环系统募集的炎症细胞与血管壁固有细胞的相互作用使炎症级联放大,形成恶性循环,使炎症反应持续存在成为慢性炎症,导致子代 As 发生。孕期炎症刺激子代动物还出现血压升高、肥胖,这些都是促发 As 的危险因素,通过恶化系统/局部炎症环境加剧 As 发展^[10]。

As 被普遍认为是多发于大中动脉上的一种多

因素参与的慢性炎症性病理过程,血脂水平升高是公认的导致 As 发生重要的始动因素,As 患者血清中血脂升高与累及的病变血管分支及其严重程度呈显著正相关^[11]。本研究结果发现,孕期 LPS 刺激子代大鼠 2 周龄呈现追赶性生长,体重持续显著增加;8 周龄时表现出以 TC、TG 及 LDL 显著升高为特征的高脂血症。高脂血症可通过引起 As 早期阶段管壁结构改变、增加血管壁脂质沉积和炎症因子入侵等途径,进而促进 As 的发生发展^[12]。结合本研究结果发现的孕期 LPS 刺激 8 周龄子代大鼠胸主动脉的显著损伤,我们有理由推测高脂血症是孕期 LPS 刺激导致子代 As 发生的又一途径。

高脂血症的形成与脂质代谢障碍密切相关。肝脏是内源性和外源性脂代谢途径的交汇点及调节中心,能够合成、释放各种脂蛋白及脂代谢酶类,在维持脂代谢平衡中发挥着重要作用。本研究中孕期 LPS 刺激子代大鼠 AST 水平显著升高,肝细胞形态异常,细胞内出现脂滴,提示肝细胞严重受损。肝脏组织超微结构显示,孕期炎症刺激导致子代肝脏线粒体明显变形、肿胀,呈空泡状,嵴排列紊乱。同时免疫荧光检测提示 mtDNA 氧化损伤的标志物 8-OHdG⁺/GAP1⁻荧光表达明显增强,线粒体膜电位显著降低。因此孕期炎症刺激子代大鼠表现出以 mtDNA 损伤为主要特征的肝脏线粒体功能障碍。mtDNA 损伤所致的线粒体功能障碍是包括肥胖、高血压、高血糖等众多危险因素相关性 As 发生的共同机制^[13]。基于 ApoE^{-/-}小鼠的研究证实了 mtDNA 损伤是 As 的早期事件和独立致病因素^[14-15]。当线粒体功能不全时,肝脏微粒体 TG 转运蛋白变异,线粒体膜流动性明显降低,TG 大量生成,导致肝脏脂代谢异常^[16];而通过提高肝细胞线粒体膜电位,可有效防治 ApoE^{-/-}小鼠高脂血症的发生和发展^[17]。因此孕期炎症刺激子代可通过肝脏线粒体功能障碍介导的血脂代谢异常而导致 As 发生。然而孕期炎症刺激子代线粒体功能障碍对肝脏脂质代谢的调控还需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Wong ND. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology[J]. Nat Rev Cardiol, 2014, 11 (5): 276-289.

[2] Siemelink MA, van der Laan SW, Timmers L, et al. Taking risk prediction to the next level. Advances in biomarker research for atherosclerosis[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19 (33): 5 929-941.

[3] Zhao SY, Liu Y, Li XH, et al. Lipopolysaccharide exposure during pregnancy leads to aortic dysfunction in offspring rats [J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e102273.

[4] Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, et al. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor-κB-mediated inflammation in macrophages [J]. Circ Res, 2014, 114 (3): 421-433.

[5] Leduc L, Levy E, Bouity-Voubou M, et al. Fetal programming of atherosclerosis: possible role of the mitochondria [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010, 149 (2): 127-130.

[6] Morrison KM, Atkinson SAPersadie R, Hunter B, et al. The family atherosclerosis monitoring in early life (FAMILY) study: rationale, design, and baseline data of a study examining the early determinants of atherosclerosis [J]. Am Heart J, 2009, 158 (4): 533-539.

[7] Alkemade FE, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, et al. Intrauterine exposure to maternal atherosclerotic risk factors increases the susceptibility to atherosclerosis in adult life [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27 (10): 2 228-235.

[8] 高胜利, 高淑红, 赵成瑞. 母亲高脂血症增加后代疾患动脉粥样硬化的机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (6): 633-636.

[9] Liao W, Wei Y, Li XH, et al. Prenatal exposure to zymosan results in hypertension in adult offspring rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35 (12): 1 413-418.

[10] Wei YL, Li XH, Zhou JZ. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28 (5): 651-656.

[11] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床 [M]. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 2009; 12.

[12] 肖维刚, 张秋艳, 贾振华, 等. 高脂血症对兔动脉管壁血流量及氧供的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (9): 870-874.

[13] 司艳红, 陈晓凤, 秦树存. 线粒体功能障碍参与动脉粥样硬化的分子机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31 (9): 897-903.

[14] Ballinger SW, Patterson C, Runge M, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis [J]. Circulation, 2002, 106 (5): 544-549.

[15] Yu E, Calvert PA, Bennett MR, et al. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans [J]. Circulation, 2013, 128 (7): 702-712.

[16] Moffat C, Bhatia L, Nguyen T, et al. Acyl-CoA thioesterase-2 facilitates mitochondrial fatty acid oxidation in the liver [J]. J Lipid Res, 2014, 55 (12): 2 458-470.

[17] 朱庆均, 郑广娟, 张文高, 等. 血脂康对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠肝细胞内 Ca²⁺ 及线粒体膜电位的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (2): 97-99.

(此文编辑 文玉珊)