

妊娠期高血压大鼠血浆中 GDF-15 表达水平的测定

唐春平,姚蓓蓓,桂 鸣*

(南京医科大学第一附属医院心脏科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:利用子宫胎盘缺血术诱发大鼠妊娠期高血压,测定妊娠期高血压大鼠血浆中生长分化因子(growth differentiation factor-15,GDF-15)表达水平。方法:清洁级健康雌性 Spragu-Dawley 大鼠 20 只,随机分成 2 组,每组 10 只,分为假手术对照组及子宫胎盘灌注下降(reduced uterine perfusion pressure,RUPP)手术组。所有大鼠自然受孕,在妊娠期 14 d 对妊娠大鼠进行手术,在妊娠期 13 d 以及 19 d 分别测定大鼠血压。于妊娠 19 d 采血测定大鼠血浆 GDF-15 含量。结果:RUPP 手术组妊娠 19 d 收缩压、舒张压与妊娠 13 d 相比均显著升高[(157.8 ± 9.0)mmHg vs (118.3 ± 5.7)mmHg;(122.5 ± 6.9)mmHg vs (88.4 ± 8.0)mmHg, $P < 0.05$],假手术组则升高不明显。妊娠 19 d RUPP 手术组与假手术组相比,收缩压、舒张压均显著升高[(157.8 ± 9.0)mmHg vs (117.0 ± 9.4)mmHg;(122.5 ± 6.9)mmHg vs (100.7 ± 4.4)mmHg, $P < 0.05$]。与假手术组相比,RUPP 手术组妊娠 19 d 血浆中 GDF-15 浓度明显增高[(363.3 ± 78.1)ng/L vs (276.7 ± 69.4)ng/L, $P < 0.05$]。结论:妊娠期高血压大鼠动物模型血浆中 GDF-15 表达水平明显增高,GDF-15 是一个预测妊娠期高血压患者预后的潜在指标。

[关键词] 生长分化因子-15;妊娠;高血压;动物模型

[中图分类号] R714.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1313-04

doi:10.7655/NYDXBNS20141004

Evaluation of plasma growth differentiation factor-15 in reduced uterine perfusion pressure rat model

Tang Chunping, Yao Beibei, Gui Ming*

(Department of Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of the study was to evaluate the growth differentiation factor-15 (GDF-15) level in the reduced uterine perfusion pressure (RUPP) rat model by using uterine placenta ischemia to induce gestational hypertension in rats. **Methods:** A total of 20 Spragu-Dawley rats were randomly divided into two groups with each group of 10 rats: the sham group and the RUPP group. The operation was taken on the 14th day after gestation. On the 13th and 19th day gestation, the blood pressure was measured. The blood was collected on the 19th day gestation for the GDF-15 test. **Results:** In the RUPP rats, both the systolic pressure and diastolic pressure increased significantly on the 19th day gestation compared with that on the 13th gestation [(157.8 ± 9.0)mmHg vs (118.3 ± 5.7)mmHg, (122.5 ± 6.9)mmHg vs (88.4 ± 8.0)mmHg, $P < 0.05$], and the sham group had no significant changes. Compared with the sham group on 19th days gestation, RUPP group rats were characterized by higher systolic pressure[(157.8 ± 9.0)mmHg vs (117.0 ± 9.4)mmHg; $P < 0.05$], higher diastolic pressure [(122.5 ± 6.9)mmHg vs (100.7 ± 4.4)mmHg; $P < 0.05$]. In the RUPP group, the GDF-15 level was significantly higher than that in the sham group [(363.3 ± 78.1)ng/L vs (276.7 ± 69.4)ng/L; $P < 0.05$]. **Conclusion:** GDF-15 level increased significantly in the gestation hypertension rats and is a potential cardiovascular prognostic maker for the gestation hypertension patients.

[Key words] GDF-15; hypertension; pregnancy; animal model

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1313-1316]

妊娠期高血压是一种妊娠期特有的疾病,其特异表现为妊娠 20 周后新发的高血压、蛋白尿、

水肿,若得不到有效控制,常可进一步导致脑、肝脏等重要器官的血管损伤,成为中晚期妊娠的一种潜在的致命性疾病^[1-2]。目前对妊娠期高血压的发病机制尚不明确,其可能的原因包括子宫胎盘低灌注、免疫因素、遗传因素以及营养缺乏^[3]。目前

[基金项目] 江苏省科技厅国际技术合作项目(BZ2010040)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: mingui99@163.com

得到大多数学者认可的妊娠期高血压发生机制是以子宫胎盘供血不足为基础导致的血管内皮功能受损学说^[4-5],妊娠期间各种原因导致的子宫胎盘灌注下降(reduced uterine perfusion pressure, RUPP)、胎盘缺血导致血管活性物质和细胞因子产生过多,如可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、血管紧张素 II 1 型受体抗体等,这些血管活性物质和细胞因子引起全身炎症性应激反应、血管内皮功能受损、血管舒张功能障碍。全身应激反应和内皮功能障碍将进一步导致血压增高、蛋白尿、血小板减少、肝功能受损等妊娠期高血压特征性变化^[6]。子宫胎盘缺血妊娠期高血压大鼠模型能够成功模拟妊娠期高血压的诸多特征性改变,已越来越多地被应用于妊娠期高血压相关的研究^[4]。

生长分化因子-15(GDF-15)属于转化生长因子超家族^[7],具有心血管保护作用,与内皮活性、血管炎症、动脉粥样硬化等方面有关,其水平与心血管危险因素、肾功能、炎症反应、心肌结构和功能受损程度相关^[8]。GDF-15在胎盘中高表达。GDF-15在某些病理状态下,如组织缺氧、炎症、氧化应激等情况下,其表达升高^[9]。

本研究采用大鼠腹主动脉下段及双侧卵巢动脉子宫支第一分叉置入银夹致子宫胎盘供血血管狭窄的方法制作妊娠期高血压大鼠模型,并测定大鼠血浆中GDF-15因子含量,从而了解GDF-15在妊娠期高血压中的作用。

1 材料及方法

1.1 材料

清洁级健康雌性 Sprague-Dawley 大鼠 20 只,体重 200~250 g。吸入用七氟烷(上海恒瑞医药有限公司)。银夹:直径 0.12、0.20 mm(上海奥尔科特生物科技有限公司)。大鼠尾动脉无创血压测量仪器(BP-2000, Visitech Systems Inc 公司,美国)。动脉血压监测仪(BeneView T5, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及孕期判断

20 只雌鼠随机分成 2 组,每组 10 只,分为假手术对照组和 RUPP 手术组。第 1 天雌鼠与雄鼠于 16:00 按 3:1 合笼 1 夜,第 2 天 9:00 进行阴道涂片,涂片找到精子为妊娠第 0 天。

1.2.2 RUPP 大鼠模型复制方法

妊娠第 14 天对妊娠大鼠进行手术,用 2%七氟烷吸入麻醉。中下腹碘伏消毒,铺洞巾,沿中下腹正中线依次切开皮肤、肌肉、腹膜,切口长约 4 cm,暴露腹主动脉下端、子宫及卵巢动脉。根据术式不同分 2 组,分别为①RUPP 手术组:于腹主动脉下段近髂动脉分叉处置入 1 枚银夹(0.20 mm),左右两侧卵巢动脉子宫支第一分叉前分别置入 1 枚银夹(0.12 mm);②假手术对照组:沿中下腹正中线依次切开皮肤、肌肉、腹膜,切口长约 4 cm,暴露腹主动脉下端、子宫及卵巢动脉,不置入银夹。随即缝合切口。

1.2.3 血压测量

妊娠第 13 天应用大鼠尾动脉无创血压测量仪器测量大鼠血压。方法为将一气囊套在大鼠尾上充气阻断尾动脉血流,再缓慢放气,通过远端血流感应器感受血流变化,测量出大鼠收缩压和舒张压。待大鼠血压平稳后开始记录,共测 3 组,每组测 10 次,取 3 组平均值作为该大鼠血压。由于腹主动脉置入银夹后尾动脉血流减少,不能准确反映血压变化,妊娠 19 d 采取颈动脉插管测量颈动脉血压。

1.2.4 血浆 GDF-15 含量酶联免疫检测

妊娠 19 d,颈动脉血压测量结束后,通过颈动脉插管收集血液,3 000 r/min,离心 5 min,收集上层血浆,用酶联免疫检测试剂盒进行血浆中 GDF-15 含量测定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较采用 t 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 母鼠血压变化

表 1 显示两组大鼠妊娠第 13、19 天收缩压和舒张压的变化情况。RUPP 手术组妊娠 19 d 收缩压、舒张压与妊娠 13 d 相比均显著升高($P < 0.05$),假手术组则升高不明显。妊娠 19 d RUPP 手术组与假手术组相比,收缩压、舒张压均显著升高($P < 0.05$)。

2.2 母鼠血浆中 GDF-15 蛋白水平

与假手术组 [(276.7 \pm 69.4)ng/L] 相比,RUPP 手术组 [(363.3 \pm 78.1)ng/L] 妊娠第 19 天血浆中 GDF-15 浓度明显增高($P < 0.05$)。

表 1 二组母鼠血压妊娠第 13 天和 19 天血压情况
Table 1 The blood pressure in the two groups on the pregnancy 13th and 19th day ($\bar{x} \pm s, \text{mmHg}$)

组别	例数	妊娠第 13 天		妊娠第 19 天	
		收缩压	舒张压	收缩压	舒张压
假手术组	10	110.3 ± 12.1	84.5 ± 8.2	117.0 ± 9.4	100.7 ± 4.4
RUPP 手术组	10	118.3 ± 5.7	88.4 ± 8.0	157.8 ± 9.0* [△]	122.5 ± 6.9* [△]

与妊娠第 13 天比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, [△] $P < 0.05$ 。

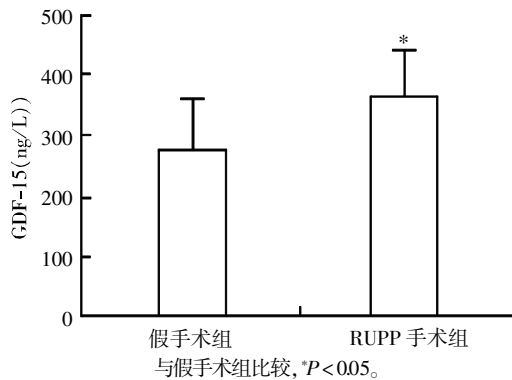


图 1 妊娠第 19 天 RUPP 组大鼠和假手术组大鼠血浆 GDF-15 浓度比较

Figure 1 Comparison of the GDF-15 concentration between groups on the 19th day

3 讨论

妊娠期高血压的病因目前尚不明确,目前主要考虑与子宫胎盘缺血所导致的一系列氧化应激及内皮功能障碍有关。子宫胎盘缺血致妊娠期高血压动物模型能成功模拟妊娠期高血压的血压增高、蛋白尿等特征,是较为接近妊娠期高血压病理发生过程的一种动物模型,目前常用来进行妊娠期高血压相关机制及治疗方法的研究。子宫胎盘缺血妊娠期高血压动物模型最早是由 Ogden 等^[10]利用犬来制作,他们研究发现,适当地使肾动脉以下的腹主动脉狭窄会导致妊娠犬的血压增高,而对未妊娠犬进行相同的处理则没有诱发高血压。但 Granger 等^[11]研究发现,如果仅仅在腹主动脉肾下段置入银夹,子宫动脉血流量可下降 40%,但随后卵巢动脉血流会代偿性增高,进一步研究发现,如果再于两侧卵巢动脉子宫支上置入银夹可保证子宫、胎盘灌流量明显下降,诱发高血压、蛋白尿,此即为目前常用的 RUPP 妊娠期高血压动物模型。此后,Sholook 等^[12]研究发现,在 RUPP 大鼠模型中,子宫和胎盘血流量分别下降 60% 和 54%。本研究采用 RUPP 动物模型,结果表明,RUPP 手术组妊娠 19 d 收缩压、舒张压与妊娠 13 d 相比均显著升高,而假手术组妊娠 19 d

收缩压及舒张压较妊娠 13 d 有所增高,但未有统计学意义。妊娠 19 d RUPP 手术组与假手术组相比,收缩压、舒张压均显著升高,这与上述研究结果相一致,于腹主动脉下段及双侧卵巢动脉子宫支第一分叉置入银夹可成功诱发妊娠高血压大鼠模型。

GDF-15 是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族成员中的一种应激反应蛋白,最初又叫巨噬细胞抑制因子-1 (macrophage inhibitory cytokine-1, MIC-1) 或非甾体抗炎药活化基因-1 (nonsleroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1, NAG-1)。于 1997 年由 Bootcov 等^[7]发现,并通过分离 cDNA、DNA 测序及转基因等方法得到重组的 MIC-1。Bottner 等^[13]于 1999 年将其命名为 GDF-15。与其他 TGF- β 超家族成员一样,GDF-15 最初形成以二硫键结合的二聚体形式的前体蛋白,然后通过蛋白水解作用把 GDF-15 前体蛋白裂解成 N-末端前肽和成熟的 GDF-15,分子量约 25 000,其细胞外分泌形式为单体蛋白,分子量约 12 000。生理条件下,GDF-15 在胎盘和前列腺中表达最高,但在心脏和其他组织器官中也有少量表达。然而,在病理或应激条件下,GDF-15 的表达会迅速上调。GDF-15 的表达可抑制心肌肥厚、抗炎、抗心肌凋亡,对心脏缺血再灌注损伤亦有保护作用^[8]。证据表明,妊娠期高血压引起的母体心血管系统内皮功能受损与今后的慢性高血压、缺血性心脏病、卒中,静脉血栓和心血管死亡相关^[14-15]。提示妊娠期高血压造成的全身心血管系统内皮功能受损将持续很长时间,对母体产生持续性的作用,从而诱发其他心血管疾病。既往研究表明 GDF-15 能够反映内皮功能活性,具有心血管系统保护作用,可以改善内皮细胞功能、促进内皮细胞增殖^[8,16]。本研究显示,RUPP 组大鼠血浆 GDF-15 水平明显高于对照组。作为一种心血管保护因子,本文推测,GDF-15 是预测妊娠期高血压患者预后的一个潜在指标。

本研究监测了 GDF-15 在妊娠高血压大鼠中的表达,但其主要来源途径、在心血管系统中的分布以及其在妊娠高血压发病过程中的作用尚有待于进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Steegers EA, von Dadelszen, Duvekot JJ, et al. Preeclampsia[J]. *Lancet*, 2010, 376(9741): 631-644
- [2] 陈丽红, 李云, 胡继芬. 子痫时可溶性血管内皮生长因子受体 1 的变化[J]. *中华高血压杂志*, 2007, 15(7): 541-544
- [3] Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia; linking placental ischemia with endothelial dysfunction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): H541-550
- [4] Gilbert JS, Nijland MJ, Knoblich P. Placental ischemia and cardiovascular dysfunction in preeclampsia and beyond; making the connections[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6(10): 1367-1377
- [5] Amash A, Huleihel M, Sheiner E, et al. Preeclampsia as a maternal vascular disease[J]. *Harefuah*, 2007, 146(9): 707-712, 733
- [6] Morteza A, Abdollahi A, Bandarian M. Serum nitric oxide syntheses and lipid profile of the mothers with IUGR pregnancies uncomplicated with preeclampsia. Does insulin resistance matter[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(2): 139-142
- [7] Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(21): 11514-11519
- [8] Eggers KM, Kempf T, Lind L, et al. Relations of growth-differentiation factor-15 to biomarkers reflecting vascular pathologies in a population-based sample of elderly subjects[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(1): 45-51
- [9] Nickel N, Jonigk D, Kempf T, et al. GDF-15 is abundantly expressed in plexiform lesions in patients with pulmonary arterial hypertension and affects proliferation and apoptosis of pulmonary endothelial cells[J]. *Respir Res*, 2011, 12(1): 62-64
- [10] Ogden E, Hildebrand GJ, Page EW. Rise of blood pressure during ischemia of gravid uterus [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1940, 43(1): 49-51
- [11] Granger JP, LaMarca BB, Cockrell K, et al. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia[J]. *Methods Mol Med*, 2006, 122: 383-392
- [12] Sholook MM, Gilbert JS, Sedeek MH, et al. Systemic hemodynamic and regional blood flow changes in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(4): H2080-H2084
- [13] Bottner M, Suter-Crazzolara C, Schober A, et al. Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues [J]. *Cell Tissue Res*, 1999, 297(1): 103-110
- [14] Powe CE, Levine RJ, Ananth Karumanchi S. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium; the role of anti-angiogenic factors and implications for later cardiovascular disease[J]. *Circulation*, 2011, 123(24): 2856-2869
- [15] McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, et al. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia; a systematic review and meta-analyses[J]. *Am Heart J*, 2008, 156(5): 918-930
- [16] Song H, Yin D, Liu Z. GDF-15 promotes angiogenesis through modulating p53/HIF-1 α signaling pathway in hypoxic human umbilical vein endothelial cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4017-4022

[收稿日期] 2014-04-23