

活性维生素 D 缺乏导致脑内加压素表达上调和脑血管功能损伤

毛志远¹, 贾 坚², 丁 炯¹, 苗登顺¹, 张露青^{1*}

(¹南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院老年医学科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**本研究探讨 1,25 二羟维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]缺乏在小鼠高血压发病的病理进程中对脑内加压素(VP)表达和脑血管功能的影响。**方法:**运用尾动脉压体积描记法、免疫组织化学、离体微血管压力肌动描记法分析和比较 2 月龄 25 羟化维生素 D 1 α 羟化酶基因敲除[1 α (OH)ase^{-/-}]小鼠和同窝野生型小鼠的平均动脉血压、脑内 VP 的表达和脑微血管反应性的变化。**结果:**1 α (OH)ase^{-/-}小鼠出现高血压表型,下丘脑室旁核和视上核 VP 表达都高于同窝野生型小鼠,大脑后动脉对乙酰胆碱的舒血管反应和对一氧化氮合酶抑制剂 L-硝基-精氨酸的缩血管反应较对照组显著降低。**结论:**1,25(OH)₂D₃ 在高血压发病过程中对脑内神经内分泌和脑血管功能起重要调控作用。

[关键词] 1,25 二羟维生素 D₃; 1 α 羟化酶; 高血压; 加压素; 脑血管反应性

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)12-1680-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20151202

Active vitamin D deficiency resulting in brain vasopressin increment and cerebrovascular dysfunction

Mao Zhiyuan¹, Jia Jian², Ding Jiong¹, Miao Dengshun¹, Zhang Luqing^{1*}

(¹Department of Anatomy, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Geriatric Medicine, the First Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to evaluate the influence of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] deficiency on brain vasopressin expression and cerebrovascular function in hypertension. **Methods:** Mean arterial pressure, brain vasopressin (VP) expression and cerebrovascular reactivity of two-month-old 1-alpha-hydroxylase [1 α (OH)ase] gene knockout mice and their wild-type littermates were analyzed and compared using tail-cuff plethysmography, immunohistochemistry and online videomicroscopy. **Results:** Compared with their wild-type littermates, 1 α (OH)ase^{-/-} mice showed high mean arterial pressure, increased VP positive neurons in hypothalamus and cerebral arteries featured markedly decreased dilatory responses to acetylcholine (ACh) and a reduced basal production of NO as exemplified by the attenuated diameter decrease during NOS inhibition with L-NNA. **Conclusion:** 1,25(OH)₂D₃ plays an important role in neuroendocrine regulation and cerebrovascular function in hypertensive progression.

[Key words] 1,25(OH)₂D₃; 1 α -hydroxylase; hypertension; vasopressin; cerebrovascular reactivity

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(12): 1680-1684]

维生素 D 是人体生长发育、保持机体健康必不可少的类固醇化合物。在体内,维生素 D 要经过肝内 25-羟化酶及肾内 1 α 羟化酶[1 α (OH)ase]的两次羟化才能形成具有活性的 1,25 二羟维生素 D₃ [1,25(OH)₂D₃]。研究表明,活性维生素 D 缺乏能增

加高血压、心血管疾病和脑血管意外的发病风险^[1-2]。

中枢下丘脑对血压维持和心血管活动具有重要调节作用,其室旁核(PVN)、视上核(SON)可通过分泌加压素(VP),参与外周血压的调节^[3]。研究表明,高血压的多种病理生理改变可干扰脑血流的正常循环和神经元的正常代谢^[4],从而加重脑损伤。活性维生素 D 对脑具有多重保护作用,包括降低神经细胞毒性、抗氧化应激及提高神经生长因子水平^[5-7]。

本实验室通过敲除 25 羟化维生素 D 1 α 羟化酶基因成功建立 1,25 (OH)₂D₃ 缺乏的小鼠模型^[5]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81200184);江苏省高校自然科学研究计划项目(11KJB310004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: luqingzh@njmu.edu.cn

1 α (OH)ase^{-/-}小鼠除了表现为低钙低磷血症、生长迟缓和佝偻病样骨改变,还出现高血压、心脏肥大和心收缩功能的损害,并伴有外周和中枢肾素-血管紧张素(RAS)活性增高^[9-10]。为了进一步明确活性维生素 D 缺乏对脑的影响,本实验运用 1 α (OH)ase^{-/-}小鼠观察脑内经典的心血管调节中枢下丘脑 VP 表达和脑血管功能的改变。

1 材料和方法

1.1 材料

通过 1 α (OH)ase^{+/-}小鼠(加拿大 McGill 大学引进)雌雄交配获得同窝配对 1 α (OH)ase^{+/-}(WT)野生型和 1 α (OH)ase^{-/-}(KO)纯合子小鼠,在南京医科大学 SPF 级实验动物中心饲养至 2 月龄。

1.2 方法

1.2.1 小鼠血压的测量

室温 20℃,两组小鼠(每组 10 只)在清醒状态下,于每日上午 9 时用 BP-2000 血压分析系统(Visitech Systems 公司,美国)测定小鼠尾动脉收缩压和舒张压,连测 1 周,计算平均动脉压(MAP)。

1.2.2 免疫组织化学染色

上述两组小鼠测血压后,行 3.5%水合氯醛(0.1 mL/10 g)腹腔注射麻醉,常规灌注、取材、石蜡包埋,将含下丘脑的组织块作连续冠状石蜡切片(厚 5 μ m),取三套相邻切片:一套用于 VP 免疫组化染色,另两套用于对照试验:①空白试验:省去 VP 免疫组化染色中的一抗,孵育切片;②置换试验:用正常兔血清代替兔抗 VP 血清。

用 0.01 mol/L PBS pH 7.4 浸洗。加 5%山羊封闭血清封闭 1 h,加抗 VP 兔源多克隆抗体(1:5 000, Millipore 公司,美国),4℃ 孵育 12 h, PBS 漂洗;加山羊抗兔(1:200, Vector 公司,美国),室温孵育 1.5 h, PBS 漂洗;二氨基联苯胺(DAB)溶液(Elite ABC Kit, Vector 公司,美国)显色, PBS 漂洗终止反应。光镜下观察、摄片、并在高倍镜下计数。

免疫组化切片采用 Leica LAS 图像分析系统(Leica 公司,德国)分析,根据《the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates》图谱^[11],每只小鼠选取 3 张相同平面的 PVN 和 SON 照片,统计 VP 免疫阳性神经元的数目。

1.2.3 微血管反应性检测

另取 1 α (OH)ase^{-/-}和 WT 小鼠各 5 只,取大脑后动脉(PCA),将 PCA 环固定于压力肌动描记仪上(Living Systems 公司,美国),浸入 Krebs 液(4℃, pH 7.4 \pm

0.1)(含 118 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 1 mmol/L KH₂PO₄, 25 mmol/L NaHCO₃, 11 mmol/L 葡萄糖)中,在 Krebs 液浴槽中给血管内缓慢加压至 60 mmHg。采用累积浓度法^[12]检测微血管环对梯度浓度乙酰胆碱(ACh 1 \times 10⁻¹¹~1 \times 10⁻⁴ mol/L)的反应性(用苯肾上腺素做预收缩),作量效曲线,曲线拟合法求 ACh 的最大舒张力(EA-max)和半数有效浓度负对数(-log[EC50], pD₂),以 ACh 的 EAmax(用血管变化直径与基础直径的百分比表示)和 pD₂ 评价血管反应性。用一氧化氮合酶(NOS)抑制剂 L-硝基-精氨酸(N^o-nitro-L-arginine, L-NNA)配制 L-NNA/Krebs 液(10⁻⁵ mol/L),将 PCA 环置于 L-NNA/Krebs 液中 35 min,每隔 5 min 记录血管直径变化,以 L-NNA 的 EAmax 评价血管反应性。

1.3 统计学方法

统计数据用均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,多样本间比较用单因素方差分析,两两比较用 SNK 法。所有数据用 Prism5.0 软件(Graph Pad 公司,加拿大)处理, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 活性维生素 D 缺乏对小鼠 MAP 的影响

2 月龄 1 α (OH)ase^{-/-}KO 小鼠的 MAP 为(128.0 \pm 4.5)mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),高于同窝 1 α (OH)ase^{+/-}WT 小鼠的 MAP 为(89.7 \pm 2.9)mmHg ($P < 0.01$)。

2.2 活性维生素 D 缺乏对小鼠下丘脑 VP 表达的影响

2.2.1 对照试验

省去 VP 免疫组化染色中的一抗或用正常兔血清代替兔抗 VP 血清,结果均为阴性。

2.2.2 小鼠下丘脑 PVN 内 VP 的表达

参照 Paxinos 和 Franklin^[11]对小鼠 PVN 亚核的划分标准,将 PVN 分为大细胞亚核和小细胞亚核, PVN 大细胞亚核包括:室旁核腹侧亚核(PaV)、室旁核内侧亚核(PaMM)、室旁核外侧亚核(PaLM)、室旁核后亚核(PaPO)。

结果显示:VP 免疫阳性神经元呈楔形集中分布于两组小鼠 PVN 的外侧部(图 1A)。VP 免疫阳性神经元主要位于 PaMM 和 PaLM。PaLM 内 VP 免疫阳性细胞密集分布在 PaMM 的背外侧,细胞多为圆形或卵圆形,以大细胞为主,染色深,胞质呈棕黄色。在 WT 和 KO 的 PVN 小细胞部,未见阳性神经元。

对两组小鼠脑切片内阳性标记细胞进行计数,

WT 和 KO 小鼠 PVN 内 VP 阳性细胞数分别为(40.8 ± 9.41)个和(132.6 ± 14.51)个(图 1E),KO 组阳性细胞数显著高于 WT 组($P < 0.001$)。

2.2.3 小鼠下丘脑 SON 内 VP 的表达

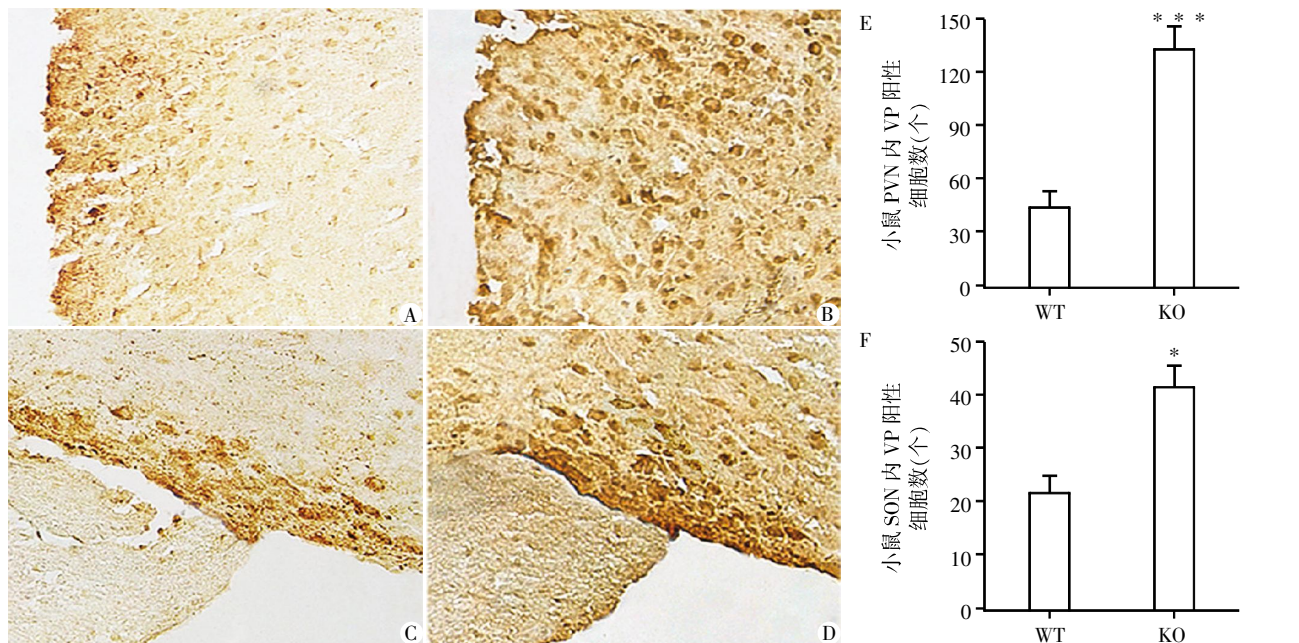
在 SON,VP 阳性神经元主要密集分布在两组小鼠 SON 的整个核团,呈内侧稍宽的带状分布于视交叉的外上方(图 1C)。这些细胞皆为大细胞型,神经元胞体大,核圆,胞质内充满棕黄色免疫阳性反应物(图 1C)。细胞计数结果表明,WT 和 KO 小鼠 SON 内 VP 阳性细胞数分别为 (21.8 ± 3.06) 个和 (41.4 ± 4.09) 个(图 1F),KO 组阳性细胞数高于 WT 组($P < 0.05$)。

2.3 活性维生素 D 缺乏对 PCA 血管反应性的影响

2 月龄 KO 小鼠 PCA 对 ACh 的舒张反应性明显降低($P < 0.001$)。与 WT 小鼠相比,ACh 血管扩张的 E_{Amax} 下降了 24.9%(图 2A),而 pD₂ 在两组小鼠无统计学差异 (WT, 7.3 ± 0.15 vs KO, 7.8 ± 0.29)。1 α (OH)ase^{-/-}小鼠 PCA 对 NOS 抑制剂 L-NNA 的直径收缩最大值 E_{Amax} 也较对照组降低 (-20%) (图 2B,表 1),KO 组血管内皮一氧化氮(NO)产生含量明显低于 WT 对照组。

3 讨论

研究发现,血 1,25(OH)₂D₃ 浓度与高血压和心血管疾病呈负相关^[13]。补充维生素 D 能降低高血压患者的血压^[14]。体内 1,25(OH)₂D₃ 缺乏时,血管内



WT 和 KO 小鼠下丘脑室旁核 PVN(A,B)和视上核 SON(C,D)VP 免疫阳性神经元($\times 200$);E:小鼠 PVN 内 VP 阳性细胞数;F:小鼠 SON 内 VP 阳性细胞数与 WT 组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$ 。

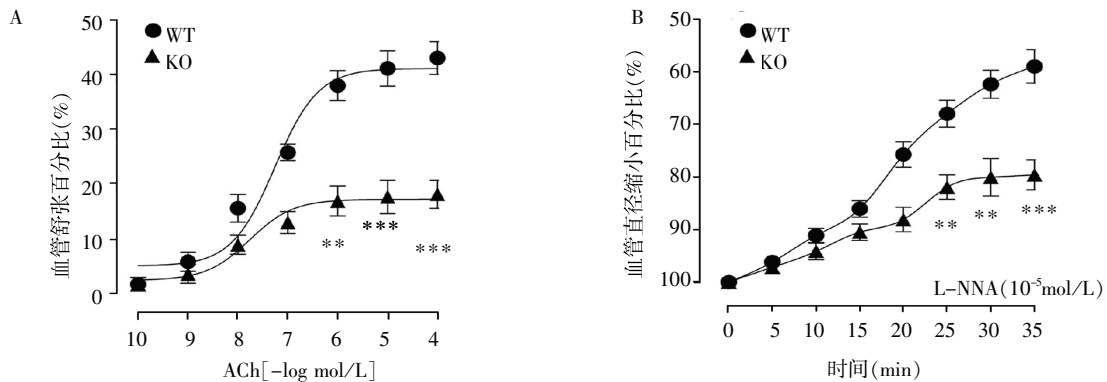
图 1 1,25(OH)₂D₃ 缺乏对下丘脑加压素 (VP) 分泌的影响

Figure 1 Effect of 1,25(OH)₂D₃ deficiency on hypothalamic vasopressin (VP) expression

皮的舒张功能下降,导致血压升高。1,25(OH)₂D₃ 可通过调节平滑肌细胞和内皮细胞功能^[15],减少血管阻力,降低血压。这些研究表明 1,25(OH)₂D₃ 对血压和 RAS 具有负性调节的作用。

本研究首次利用 1 α (OH)ase 基因敲除小鼠模型探讨 1,25(OH)₂D₃ 缺乏对脑内 VP 分泌和脑血管功能的影响。既往研究表明,内源性 1,25(OH)₂D₃ 缺乏可导致外周和中枢的氧化应激增加,激活外周和中枢 RAS,导致血压增高^[9-10]。研究表明,自发高血压大鼠(SHR)通过 VP 释放增加和交感神经兴奋引发高血压^[16]。双侧 PVN 内注射血管紧张素(Ang)的

反义寡核苷酸可使 SHR 的血浆 VP 水平显著降低,脑室内注射 Ang 也可使 PVN 对 VP 的释放增多^[17]。本研究发现伴随 1 α (OH)ase^{-/-}小鼠高血压的出现,小鼠下丘脑 PVN 和 SON 内 VP 表达也增加。说明 1,25(OH)₂D₃ 缺乏能够导致小鼠中枢 RAS 和 VP 等神经内分泌激素水平的改变。免疫组化实验证实,在大鼠下丘脑 PVN 和 SON 神经元维生素 D 结合蛋白与加压素有部分共存现象^[18]。本研究中 1 α (OH)ase^{-/-}小鼠下丘脑 SON 和 PVN 内 VP 免疫阳性神经元明显高于同窝 WT 小鼠,从而推测中枢维生素 D 缺乏可通过激活中枢 RAS 系统间接或直接刺激下丘脑内大



与 WT 组(●)相比,KO 小鼠(▲)ACh 舒血管作用(A)和 NOS 抑制剂 L-NNA 缩血管作用(B)受损。与 WT 组相比,** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$ 。

图 2 1,25(OH)₂D₃ 缺乏对脑血管反应性的影响

Figure 2 Effect of 1,25(OH)₂D₃ deficiency on the cerebrovascular reactivity

表 1 1 α (OH)ase^{-/-}KO 小鼠和同窝 WT 小鼠脑血管对 ACh 和 NOS 抑制剂 L-NNA 的反应性

Table 1 Cerebrovascular reactivity to ACh and NOS inhibition with L-NNA of 1 α (OH)ase^{-/-} mice and wild-type littermates (n=5, $\bar{x} \pm s_x$)

药物	WT	KO
ACh (E _{Amax})	43.0 \pm 3.0	18.1 \pm 2.6*
ACh (pD ₂)	7.3 \pm 0.2	7.8 \pm 0.3
L-NNA (E _{Amax})	59.0 \pm 3.2	79.6 \pm 2.8*

E_{Amax}: 对 ACh 的最大舒张百分比或用 NOS 抑制剂 L-NNA 处理 35 min 后收缩的最大减少直径;pD₂: 半数有效浓度负对数,ACh 与受体的亲和力。与 WT 组比较,* $P < 0.001$ 。

细胞神经元 VP 的分泌。

脑内存在脑血流与神经元活动联系的机制,称为神经血管单元^[19]。高血压可导致脑小动脉和微动脉病变,脑组织低灌注和缺氧,损伤神经血管单元偶联活动,进一步加重脑功能损伤。临床对脑缺血患者进行 MR 影像学调查,结果显示,血中 25 羟维生素 D 水平降低(≤ 25 nmol/L)与腔隙性脑梗死、白质高信号和脑的微出血高度相关,活性维生素 D 缺乏参与了脑微小血管疾病的发病^[20]。本实验观察了小鼠脑血管对 ACh 的舒血管和对 L-NNA 的缩血管累积效应,发现 1,25(OH)₂D₃ 缺乏小鼠脑血管反应性明显下降。说明低水平 1,25(OH)₂D₃ 可导致中枢脑血管功能损伤。

本研究中 1,25(OH)₂D₃ 缺乏可以导致下丘脑 VP 表达增多,脑血管反应性降低,综合本课题组前期的研究成果^[11],1,25(OH)₂D₃ 缺乏引起小鼠外周和中枢 RAS 活性增高,提示 1,25(OH)₂D₃ 能够通过调节神经内分泌系统和脑血管功能发挥脑保护作用,从而为阐明 1,25(OH)₂D₃ 在血压调节中的中枢作用机制,为使用 1,25(OH)₂D₃ 防治高血压和保护脑功

能提供实验依据和理论基础。

[参考文献]

- [1] Ozcan OU, Gurlek A, Gursoy E, et al. Relation of vitamin D deficiency and new-onset atrial fibrillation among hypertensive patients[J]. J Am Soc Hypertens, 2015, 9(4): 307-312
- [2] Majumdar V, Prabhakar P, Kulkarni GB, et al. Vitamin D status, hypertension and ischemic stroke: a clinical perspective[J]. J Hum Hypertens, 2015, 29(11): 669-674
- [3] Japundzic-Zigon N. Vasopressin and oxytocin in control of the cardiovascular system[J]. Curr Neuropharmacol, 2013, 11(2): 218-230
- [4] Bohm M, Schumacher H, Leong D, et al. Systolic blood pressure variation and mean heart rate is associated with cognitive dysfunction in patients with high cardiovascular risk[J]. Hypertension, 2015, 65(3): 651-661
- [5] Levenson CW, Figueiroa SM. Gestational vitamin D deficiency: long-term effects on the brain[J]. Nutr Rev, 2008, 66(12): 726-729
- [6] Annweiler C, Schott AM, Berrut G, et al. Vitamin D and ageing: neurological issues[J]. Neuropsychobiology, 2010, 62(3): 139-150
- [7] Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1053: 319-329
- [8] Panda DK, Miao D, Tremblay ML, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(13): 7498-7503
- [9] Zhou C, Lu F, Cao K, et al. Calcium-independent and 1,25(OH)₂D₃-dependent regulation of the renin-angiotensin system in 1 α -hydroxylase knockout mice[J]. Kidney

- Int, 2008, 74(2): 170-179
- [10] Zhang W, Chen L, Zhang L, et al. Administration of exogenous 1,25(OH)₂D₃ normalizes overactivation of the central renin-angiotensin system in 1alpha(OH)ase knockout mice[J]. Neurosci Lett, 2015, 588: 184-189
- [11] Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates [M]. San Diego: Academic Press Inc, 2001: 212
- [12] Zhang L, Papadopoulos P, Hamel E. Endothelial TRPV4 channels mediate dilation of cerebral arteries: impairment and recovery in cerebrovascular pathologies related to Alzheimer's disease [J]. Br J Pharmacol, 2013, 170(3): 661-670
- [13] Abbasi F, Feldman D, Caulfield MP, et al. Relationship among 25-hydroxyvitamin D concentrations, insulin action, and cardiovascular disease risk in patients with essential hypertension [J]. Am J Hypertens, 2015, 28(2): 266-272
- [14] Vimalaswaran KS, Cavadino A, Berry DJ, et al. Association of vitamin D status with arterial blood pressure and hypertension risk: a mendelian randomisation study [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(9): 719-729
- [15] Cardus A, Panizo S, Encinas M, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates VEGF production through a vitamin D response element in the VEGF promoter [J]. Atherosclerosis, 2009, 204(1): 85-89
- [16] Zhang F, Sun HJ, Xiong XQ, et al. Apelin-13 and APJ in paraventricular nucleus contribute to hypertension via sympathetic activation and vasopressin release in spontaneously hypertensive rats [J]. Acta Physiol(Oxf), 2014, 212(1): 17-27
- [17] Kagiya S, Tsuchihashi T, Abe I, et al. Antisense inhibition of angiotensinogen attenuates vasopressin release in the paraventricular hypothalamic nucleus of spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res, 1999, 829(1-2): 120-124
- [18] Jirikowski GF, Kaunzner UW, Dief Ael E, et al. Distribution of vitamin D binding protein expressing neurons in the rat hypothalamus [J]. Histochem Cell Biol, 2009, 131(3): 365-370
- [19] Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Cerebrospinal fluid biomarkers of neurovascular dysfunction in mild dementia and Alzheimer's disease [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2015
- [20] Chung PW, Park KY, Kim JM, et al. 25-hydroxyvitamin D status is associated with chronic cerebral small vessel disease [J]. Stroke, 2015, 46(1): 248-251

[收稿日期] 2015-06-16

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, (2~6)×10³ 或2×10³~6×10³, 30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)