

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.02.009

激活 AMPK 对妊娠高血压大鼠 HO-1 水平、血压和尿蛋白的影响

叶海琼,傅晓冬[△],钟 华

(西南医科大学附属医院妇产科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨激活 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)对妊娠高血压大鼠的保护作用。**方法** 建立妊娠高血压大鼠模型,用 AMPK 特异性激动剂阿卡地新(AICAR)干预后,分为正常妊娠组、亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)组、L-NAME+AICAR 组,测量大鼠血压,ELISA 测定 24 h 尿蛋白,胎盘组织苏木精-伊红(HE)染色,免疫组织化学检测 AMPK、血红素氧合酶-1(HO-1)表达的细胞定位,Western blot 检测胎盘组织 AMPK、HO-1 表达水平。**结果** 与正常妊娠组孕鼠比较,L-NAME 组孕鼠血压升高,24 h 尿蛋白水平显著增加,AMPK、HO-1 表达水平降低($P<0.05$)。与 L-NAME 组比较,L-NAME+AICAR 组血压降低,24 h 尿蛋白减少,AMPK、HO-1 表达水平升高($P<0.05$)。**结论** 激活 AMPK 可提高妊娠高血压大鼠 HO-1 水平、降低血压及减少 24 h 尿蛋白。

[关键词] 高血压,妊娠性;AMP 依赖的蛋白激酶;血红素氧合酶-1;24 小时尿蛋白

[中图法分类号] R714.252 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)02-0217-04

Effects of AMPK activation on HO-1 level,blood pressure and urinary protein in gestational hypertensive rats

YE Haiqiong ,FU Xiaodong[△] ,ZHONG Hua

(Department of Obstetrics and Gynecology ,the Affiliated Hospital of Southwest Medical University ,Luzhou ,Sichuan 646000 ,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective role of AMPK activation in gestational hypertensive rat model. **Methods** Rat model was established through administration of L-nitro-arginine methylester (L-NAME) and intervened by 5-aminoimidazole-4-carboxamide1-β-D-ribofuranoside (AICAR),a AMPK specific activator. There were three groups,the normal group,the L-NAME group and the L-NAME+AICAR group. Blood pressure was monitored,and 24 h urine protein was measured by ELISA. The placental tissue was stained with hematoxylin and eosin (HE) and the expression of AMPK and HO-1 was detected by immunohistochemistry staining and Western blot. **Results** Comparing with the L-NAME group,L-NAME+AICAR rats showed decreasing blood pressure and reducing 24 h urine protein level with increasing AMPK and HO-1 expression ($P<0.05$). **Conclusion** AMPK activation can up-regulate the expression of HO-1,reduce the blood pressure and 24 h urinary protein in gestational hypertensive rats.

[Key words] hypertension, pregnancy-induced; adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase; heme oxygenase-1; 24 hour urine protein

妊娠期疾病是妊娠期特有的疾病,是孕产妇和围生儿死亡的主要原因之一^[1-3]。因此,研究该疾病的发病机制和有效治疗靶点十分迫切。AMP 依赖的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase,AMPK)是生物能量代谢调节的关键分子,它表达于各种代谢相关的器官中,能被机体各种刺激激活^[4-5]。血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)可能与妊娠高血压的发病相关^[6-7],AMPK 作为 HO-1 的上游调控因子,是否参与了妊娠期高血压的发病,目前尚不明确。因此,本研究探讨妊娠高血压发病过程中 AMPK 表达的变化,以及激活 AMPK 对妊娠期高血压大鼠的保护作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2 月龄的雄性和雌性 SD 大鼠各 30 只,按雌雄 1:1 大鼠合笼,次日清晨用生理盐水蘸湿小棉签,取雌鼠阴道分泌物并进行涂片,白片置于显微镜下观察,发现精子计为第 0 天;妊娠第 12 天测量所有孕鼠基础血压并收集 24 h 尿量,于妊娠第 14 天将妊娠大鼠分为 3 组,分别为正常妊娠组,一氧化氮(NO)合酶抑制剂亚硝基左旋精氨酸甲酯(L-NAME)组,L-NAME+阿卡地新(AICAR)组,每组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 妊娠第 14 天开始两组给予 L-NAME 80 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃,建立大鼠妊娠期高

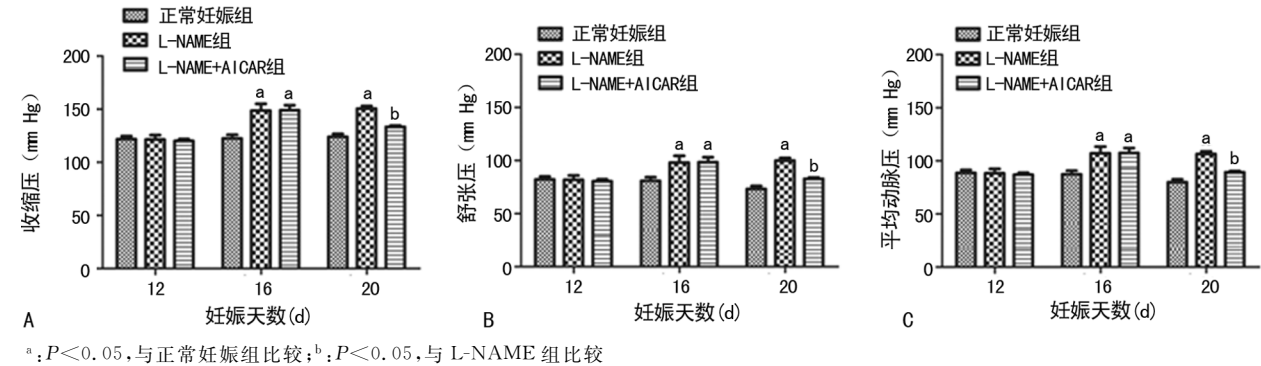


图 1 各组孕鼠血压水平变化

血压模型,正常妊娠组予等量生理盐水灌胃对照。L-NAME 处理后 2 d(妊娠第 16 天)再次测量各组孕鼠血压,后两组血压升高达大鼠高血压诊断标准者纳入实验,继续每日灌胃 L-NAME 80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,共 7 d,L-NAME + AICAR 组于妊娠第 16 天开始同时给予 AICAR 10 mg/kg 腹腔注射 4 d。

1.2.2 血压测定 用无创大鼠尾动脉血压检测仪(玉研仪器公司)于妊娠第 12、16、20 天测量各组孕鼠尾动脉血压(即尾容积法测量大鼠血压);将孕鼠放入固定器内,将气囊套在大鼠尾巴中部,连接好测量仪,脉搏传感器,待大鼠安静且血压测量仪上出现稳定脉搏波形时,测量血压,每测量 1 次后待脉搏波形恢复平稳后进行下次测量,每只大鼠测量 5 次,取平均值,凡处理后收缩压比处理前高 20 mm Hg 且高于 115 mm Hg 者确定为高血压模型。

1.2.3 24 h 尿蛋白测定 妊娠第 12、16、20 天收集各组孕鼠 24 h 尿量,当天每个标本各组 5 mL 于本院生化室自动生化分析仪测 24 h 尿蛋白。

1.2.4 胎盘组织苏木精-伊红(HE)染色 孕鼠胎盘取材后经 4%多聚甲醛浸泡,浸蜡后包埋,切片,脱蜡,水化,苏木精染色,冲洗,1%盐酸乙醇分化,流水蓝化,伊红染色,冲洗,梯度乙醇脱水,松节油透明,封片。

1.2.5 免疫组织化学检测 AMPK、HO-1 定位和表达 取各组孕鼠胎盘组织常规方法进行石蜡包埋,切片,白片置于 60 ℃烘箱烤片 2 h,使组织片黏附于玻片上,取出自然冷却,脱蜡,蒸馏水浸洗,抗原修复,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 3 min。孵育一抗:滴加 1 : 100 稀释过的兔抗 HO-1 抗体 100 μL,均匀敷于组织上,置于 4 ℃冰箱中过夜,同时以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.6 Western blot 取各组胎盘组织 100 mg,裂解,提取蛋白质,进行电泳分离,转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,选取 HO-1 抗体(1 : 1 000)4 ℃过夜,TTBS 洗 3 次后,孵育二抗,采用化学发光法,对条带进行显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行数据分

析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 法进行检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠一般情况 L-NAME 组和 L-NAME + AICAR 组大鼠经过 L-NAME 处理后与处理前的血压进行比较,均有显著升高($P < 0.05$)。在实验期间各组孕鼠生活状态良好,并未发生死亡。

2.2 各组孕鼠血压水平 妊娠第 12 天,各组怀孕大鼠的收缩压、舒张压及平均动脉压两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。妊娠第 16 天,与正常妊娠组比较,L-NAME 组、L-NAME + AICAR 组孕鼠的收缩压、舒张压和平均动脉压均有明显升高($P < 0.05$),L-NAME 组与 L-NAME + AICAR 组孕鼠的血压比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。妊娠第 20 天,与正常妊娠组比较,L-NAME 组及 L-NAME + AICAR 组孕鼠的收缩压、舒张压和平均动脉压均有升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常妊娠组的血压在妊娠第 12、16、20 天变化不大,见图 1。

2.3 24 h 尿蛋白情况检测 妊娠第 12 天各组孕鼠 24 h 尿蛋白水平两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。妊娠第 16 天开始,L-NAME 组和 L-NAME + AICAR 组孕鼠的尿蛋白水平增加。妊娠第 20 天,与正常妊娠组比较,L-NAME 组 24 h 尿蛋白水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。给予 AICAR 后,24 h 尿蛋白水平显著降低,与 L-NAME 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组孕鼠 24 h 尿蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$,mg)			
组别	妊娠第 12 天	妊娠第 16 天	妊娠第 20 天
正常妊娠组	6.75 ± 1.46	6.79 ± 1.19	6.77 ± 1.06
L-NAME 组	6.69 ± 2.10	7.68 ± 1.27	12.31 ± 2.18 ^a
L-NAME + AICAR 组	6.81 ± 1.78	7.89 ± 1.03	10.46 ± 1.78 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与正常妊娠组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 L-NAME 组比较

2.4 各组孕鼠胎盘的形态变化 各组孕鼠胎盘海绵

滋养层无显著变化。正常妊娠组大鼠母血间隙最宽，L-NAME 组母血间隙最薄，给予 AICAR 处理后，母血间隙宽度介于正常妊娠组和 L-NAME 组之间，见图 2。

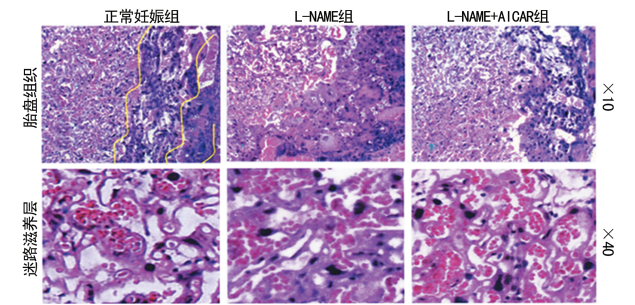


图 2 各组大鼠胎盘组织 HE 染色

2.5 胎盘组织中 AMPK 和 HO-1 表达的细胞定位 在正常妊娠组，棕色的 AMPK 阳性细胞大量存在；在 L-NAME 组，AMPK 阳性细胞数显著减少，给予 AICAR 后，AMPK 阳性细胞数有所回升。HO-1 阳性细胞和 AMPK 阳性细胞的表达部位相似，正常妊娠组最高，L-NAME 组最低，L-NAME + AICAR 组有增强但未达到正常妊娠组水平，见图 3。

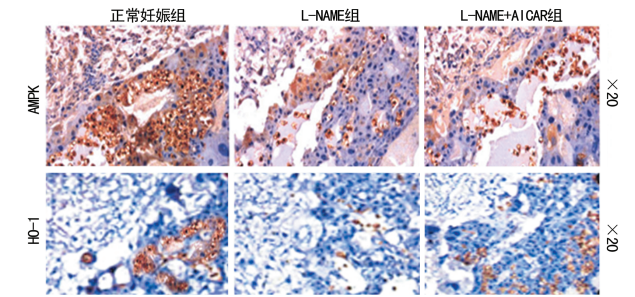


图 3 胎盘组织 AMPK、HO-1 表达

2.6 胎盘组织中 AMPK 和 HO-1 表达水平 与正常妊娠组比较，L-NAME 组 AMPK 和 HO-1 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与 L-NAME 组比较，L-NAME + AICAR 组 AMPK 和 HO-1 表达水平有显著性升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见图 4。

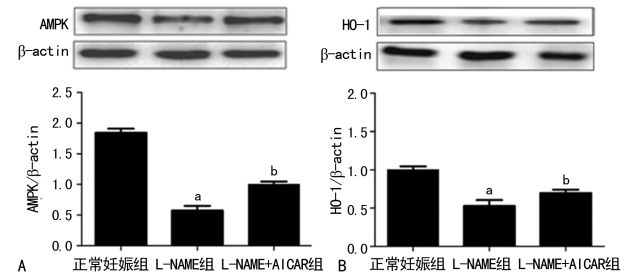


图 4 AMPK、HO-1 在胎盘组织中的表达水平

3 讨 论

妊娠期高血压是妊娠期特有的疾病。由于其发病机制尚不明确，治疗方法也受到限制^[8]。NO 由血管内皮细胞产生，目前被证实能够调节血管张力，扩

张血管，对妊娠期心血管系统有调节作用^[9]。L-NAME 是 NO 的抑制剂，能够抑制 NO 合成^[10]。因此，本研究中采用 L-NAME 建立妊娠期高血压模型，符合血管内皮细胞受损是妊娠期高血压发病的中心环节这一理论，也是国内外学者广泛应用的妊娠期高血压模型^[11]。

AMPK 是生物能量代谢调节的关键因子，能被细胞压力、运动、激素及能影响细胞代谢的物质等多种刺激激活。有报道表明，激活 AMPK 对高血压有保护作用^[12-13]。HO-1 是血红素分解代谢过程中的限速酶，也是胎盘发育和血管形成的重要因子，已被证实是 AMPK 的下游调控因子。HO-1 是近年来发现的可能与妊娠期高血压发病相关的重要因子，具有调节血管性能、松弛血管平滑肌的作用，对胎盘结构和胎盘血管发育具有直接作用^[14]。有研究表明，HO-1 通过保护内皮细胞功能调节血压，可能与妊娠期高血压的发病相关^[15-17]，但 AMPK 作为其上游调控因子，是否参与了妊娠期高血压的发病及是否可以作为治疗的靶点尚不明确。

HO-1 是诱导型血红素氧合酶，在正常妊娠胎盘组织中高表达，主要定位于胎盘合体滋养细胞，与绒毛血管的生成和发育有关^[18-19]。研究表明，HO-1 具有松弛平滑肌，调节血管性能的作用，对胎盘结构和胎盘血管发育具有直接的调节作用，维持正常妊娠，影响胎儿生长发育^[20]。流产大鼠模型实验表明，HO-1 能够激活 T 细胞，提高胎儿耐受，对自然流产患者具有保护作用，抑制 HO-1 表达后，保护作用消失^[21]。与孕早期相比，在足月胎盘中 HO-1 表达显著升高，提示在胎盘血管形成和重塑方面 HO-1 可能发挥了重要作用^[22-23]。本研究中，L-NAME 组胎盘组织中 AMPK、HO-1 表达与正常妊娠组比较有所下降，L-NAME + AICAR 组表达较 L-NAME 组表达有明显上调，表明 AMPK、HO-1 可能参与了妊娠期高血压的发生、发展。

有研究报道，海绵滋养层内部有部分滋养细胞的细胞质富含糖原，命名为糖原细胞，在成熟胎盘组织中，糖原细胞溶解释放糖原和激素，导致细胞质空泡变，呈现为簇状聚集^[24]。本研究中，AMPK、HO-1 也主要表达与海绵滋养层的细胞内，因此笔者推测 AMPK 和 HO-1 在此类细胞中高表达，可能与其能量代谢活跃有关，但在正常妊娠和妊娠高血压中发挥什么样的作用，还需要进行更深入的研究。

综上所述，本研究表明 AMPK、HO-1 的表达与大鼠妊娠期高血压具有相关性，可能与妊娠期高血压的发病机制有关。AICAR 能增加 HO-1 的表达并在一定程度上降低血压，减少 24 h 尿蛋白，激活 AMPK 是否能成为妊娠期高血压的潜在治疗靶点需进一步

研究。

参考文献

- [1] ORNOY A, KOREN G. Selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy: do we have now more definite answers related to prenatal exposure[J]. *Birth Defects Res*, 2017, 109(12): 898-908.
- [2] WEBSTER L M, CONTI-RAMSDEN F. Impact of anti-hypertensive treatment on maternal and perinatal outcomes in pregnancy complicated by chronic hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(5): e005526.
- [3] MAGRO-MALOSSO E R, SACCONI G. Exercise during pregnancy and risk of gestational hypertensive disorders: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(8): 921-931.
- [4] YANG X, HUANG M. Activity of isoliensinine in improving the symptoms of type 2 diabetic mice via activation of AMP-activated kinase and regulation of PPAR γ [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(33): 7168-7178.
- [5] LI X, LEE Y J. Sirt1 negatively regulates Fc ϵ sRI-mediated mast cell activation through AMPK- and PTP1B-dependent processes[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6444.
- [6] JUNG T W, KIM H C. Protectin DX suppresses hepatic gluconeogenesis through AMPK-HO-1-mediated inhibition of ER stress[J]. *Cell Signal*, 2017, 34: 133-140.
- [7] ZHANG D, FU L. Therapeutic benefit of mesenchymal stem cells in pregnant rats with angiotensin receptor agonistic autoantibody-induced hypertension: implications for immunomodulation and cytoprotection[J]. *Hypertens Pregnancy*, 2017, 36(3): 247-258.
- [8] O'SHEA P M, GRIFFIN T P. Hypertension: the role of biochemistry in the diagnosis and management[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 465: 131-143.
- [9] VEST A R, CHO L S. Hypertension in pregnancy[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2014, 16(3): 395.
- [10] RAGY M M, AZIZ N M. Prevention of renal ischemia/perfusion-induced renal and hepatic injury in adult male Albino rats by oxytocin: role of nitric oxide[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2017, 28(6): 615-621.
- [11] SHI D D, GUO J J. Epigallocatechin gallate enhances treatment efficacy of oral nifedipine against pregnancy-induced severe pre-eclampsia: a double-blind, randomized and placebo-controlled clinical study[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2018, 43(1): 21-25.
- [12] CAO X, LUO T. Resveratrol prevents Ang II-induced hypertension via AMPK activation and RhoA/ROCK suppression in mice[J]. *Hypertens Res*, 2014, 37(9): 803-810.
- [13] BANEK C T, BAUER A J. AICAR administration ameliorates hypertension and angiogenic imbalance in a model of preeclampsia in the rat[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(8): H1159-1165.
- [14] AYCAN-USTYOL E, KABASAKAL M. Vascular function and arginine and dimethylarginines in gentamicin-induced renal failure: a possible effect of heme oxygenase-1 inducer hemin[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2017, 95(12): 1406-1413.
- [15] MAHMIUD A M, ALQAHTANI S. Commiphora molle modulates glutamate-nitric oxide-cGMP and Nrf2/ARE/HO-1 pathways and attenuates oxidative stress and hematological alterations in hyperammonemic rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7369671.
- [16] SONG W, CRESSATTI M. Parkinsonian features in aging GFAP. HMOX1 transgenic mice overexpressing human HO-1 in the astroglial compartment[J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 58: 163-179.
- [17] LI J, ZHOU J. Increased heme oxygenase-1 and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 in the placenta have a cooperative action on preeclampsia[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2016, 81(6): 543-551.
- [18] WANG F, XIAO M. Expression of heme oxygenase-1 and leukemia inhibitory factor in maternal plasma and placental tissue in a lipopolysaccharide-induced late pregnancy preterm birth mouse model[J]. *J Reprod Med*, 2016, 61(1): 39-46.
- [19] ZHAO H, OZEN M. Heme oxygenase-1 in pregnancy and cancer: similarities in cellular invasion, cytoprotection, angiogenesis, and immunomodulation[J]. *Front Pharmacol*, 2015, 5: 295.
- [20] ZHANG D, WANG L. The role of the reduction of spiral artery remodeling and heme oxygenase 1 in mediating AT1-AA-induced hypertension and intrauterine growth restriction in pregnant rats[J]. *Am J Perinatol*, 2014, 31(10): 883-890.
- [21] KAHLO K, FILL M, ALFERTHEINER S. HO-1 as modulator of the innate immune response in pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 70(1): 24-30.
- [22] LEVYTSKA K, KINGDOM J. Heme oxygenase-1 in placental development and pathology[J]. *Placenta*, 2013, 34(4): 291-298.
- [23] FOX K A, LEE W. Prenatal diagnosis and evaluation of abnormal placentation[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2017, 60(3): 596-607.
- [24] FIDOAMORE A, CRISTIANO L. Energy metabolism in glioblastoma stem cells: PPAR α a metabolic adaptor to intratumoral microenvironment[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 108430-108450.

(收稿日期: 2018-07-18 修回日期: 2018-10-01)