

叶酸对高血糖孕鼠子代心脏发育相关蛋白表达的影响

詹一科¹, 仇小强², 马若嘉¹

摘要 目的 探讨叶酸对高血糖孕鼠子代心脏发育相关蛋白 GATA4、Nkx2.5 表达的影响。方法 将受孕的 40 只 SD 大鼠随机均分为 5 组: 正常对照组、模型组、叶酸第 3 天组 (FA3rd 组)、叶酸第 7 天组 (FA7th 组)、叶酸第 15 天组 (FA15th 组); 确认受孕后, 除正常对照组外, 其他 4 个组一次性按 38 mg/kg 予腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 复制高血糖孕鼠模型, 其中 FA3rd 组、FA7th 组、FA15th 组 3 个干预组分别从孕第 3、7、15 天开始, 每天予叶酸 0.8 mg/kg 灌胃至妊娠结束。在孕鼠孕 21 d 时取子鼠心脏, HE 染色观察子鼠心

肌; 免疫组化法及 Western blot 法检测子鼠心脏发育相关基因 GATA4、Nkx2.5 的蛋白表达。结果 STZ 干预后孕鼠血糖明显升高 ($P < 0.05$), 部分子鼠心肌可见损伤; 免疫组化显示, GATA4 蛋白在心房、心室、室间隔、瓣膜均有表达; Nkx2.5 蛋白在心房、心室、室间隔均有表达, 但在瓣膜未见明显表达; Western blot 显示, 与正常对照组比较, STZ 干预组 GATA4 及 Nkx2.5 蛋白表达均下调 ($P < 0.05$), FA3rd 组及 FA7th 组的蛋白表达水平均显著高于模型组 ($P < 0.05$), 且 FA3rd 组的蛋白上调程度高于 FA7th 组 ($P < 0.05$), FA15th 组与模型组的蛋白表达水平差异无统计学意义。结论 孕鼠的高血糖状态可使子代心脏损伤及心脏发育相关蛋白 GATA4、Nkx2.5 表达水平下调; 及时补充叶酸可上调 GATA4、Nkx2.5 蛋白表达水平, 对处于母体高血糖状态影响下的子鼠心脏的发育可能具有保护作用。

关键词 叶酸; 心脏发育; 子代; 母体高血糖

中图分类号 R 725.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-0905-05

2014-01-05 接收

基金项目: 广西自然科学基金重点项目 (编号: 2010GXNSFD013054)

作者单位: ¹ 桂林医学院附属医院心血管内科, 桂林 541001

² 广西医科大学公共卫生学院, 南宁 530021

作者简介: 詹一科, 男, 住院医师, 硕士研究生;

仇小强, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

xqiu9999@sina.com

Relations of cardiopulmonary dysfunction and TGF- β 1/Smad2, 4, 7 pathway in rats of adjuvant arthritis

Huang Chuanbing, Wan Lei, Liu Jian, et al

(Dept of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031)

Abstract **Objective** To study the changes of cardiopulmonary function and transforming growth factor beta1 (TGF- β 1)/Smad2, 4, 7 pathway in rats of adjuvant arthritis (AA). **Methods** Thirty rats were randomly divided into normal control group and model group. The model group was intracutaneously injected with 0.1 ml of Freund's complete adjuvant in the right hindlimb. After nineteen days of inflammatory-induction, paw swelling and arthritis index (AI) were observed cardiac function was tested using ultrasonic diagnostic, and pulmonary function was tested using small animal spirometer. The expressions of TGF- β 1, Smad2, Smad4, Smad7 protein were detected by Western blot. **Results** Compared with normal control group, paw swelling, AI, TGF- β 1, Smad2, Smad4 protein were increased, and cardiopulmonary function parameters, cardiopulmonary, Smad7 protein were decreased in rats of AA ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There were negative correlations between paw swelling and 75% of vital capacity maximum expiratory flow (FEF₇₅), AI and maximum forced expiratory flow (MFEF), TGF- β 1 and fractional shortening (FS), 50% of vital capacity maximum expiratory flow (FEF₅₀), Smad4 and peak early diastolic velocity (E), FEF₇₅ ($P < 0.01$, $P < 0.05$). There were positive correlations between AI and left ventricular diastolic diameter (LV), Smad2 and left atrial diastolic diameter (LA), Smad7 and FEF₇₅, MFEF ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** Heart and lung function impairment may be associated with excessive activation in signaling pathways of TGF- β 1/Smad2, 4, 7 in AA.

Key words adjuvant arthritis; cardiac function; pulmonary function; Smad pathway; transforming growth factor

目前普遍认为先天性心脏病是遗传及环境因素交互作用出现的结果,孕妇处于危险环境因素中对子代出现先天性心脏病有重要影响,如怀孕早期出现合并症可提高胎儿先天性心脏病的发病率($OR = 2.851$)^[1]。体外心肌细胞研究^[2]显示,高糖状态中心脏发育因子 GATA4 在心肌细胞中的表达显著减少。高糖状态也可引起斑马鱼胚胎及心脏发育落后^[3]。孕妇患糖尿病与胎儿的先天性心脏缺陷发生率增加相关,高血糖被认为是主要的致畸因素^[4]。服用叶酸可降低子代先天性心脏病的发病风险,但机制尚不明确^[5]。叶酸对高血糖孕鼠子代心脏发育相关基因的作用研究报道较少。该研究通过观察在不同时期服用叶酸对孕鼠妊娠期高血糖状态下子鼠心脏发育的影响,探讨叶酸维持子鼠心肌正常发育的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 SD 大鼠 40 只,雌性,购自桂林医学院实验动物中心,8~12 周龄,270~310 g,饲养于无特定病原体级(SPF)环境,室温 18~25℃,相对湿度 50%~80%。

1.2 主要试剂与仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司);叶酸片剂(北京斯利安药业);小鼠抗大鼠 Nkx2.5 抗体、小鼠抗大鼠 GATA4 抗体(美国 Santa Cruz 公司);HRP 标记山羊抗小鼠抗体、SP 法免疫组化试剂盒、DAB 显色盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);ECL 发光剂(上海碧云天公司);湿转膜仪、硝酸纤维素膜(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型建立 适应性喂养 1 周后,采尾血测空腹血糖,并去除血糖值异常的雌鼠。雌鼠与雄鼠按 1:1 合笼过夜,次日早晨见阴栓或阴道涂片光镜下观察到精子视为妊娠 0.5 d。受孕鼠独笼饲养,未受孕者继续与雄鼠合笼。将 40 只成功受孕母鼠随机均分为 5 组(各组 $n = 8$):正常对照组(正常妊娠)、模型组(妊娠高血糖)、叶酸第 3 天组(FA3rd 组,妊娠高血糖 + 妊娠第 3 天叶酸干预)、叶酸第 7 天组(FA7th 组,妊娠高血糖 + 妊娠第 7 天叶酸干预)、叶酸第 15 天组(FA15th 组,妊娠高血糖 + 妊娠第 15 天叶酸干预)。除正常对照组外,其他 4 个组于确认受孕当天禁食 12 h 后,按 38 mg/kg 一次性予 STZ(用 pH 4.5、浓度为 0.1 mmol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配成 1% STZ 溶液)腹腔快速

注射。正常对照组于确认受孕当天禁食 12 h 后,一次性予等量 0.1 mmol/L、pH 4.5 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液腹腔注射作为对照。FA3rd、FA7th、FA15th 组分别于妊娠第 3、7、15 天开始,每日一次予叶酸 0.8 mg/kg 灌胃,正常对照及模型组于妊娠第 3 天开始以等量蒸馏水灌胃,5 组均灌胃至妊娠结束。

建模成功判断: STZ 腹腔注射 48 h 后采尾血测血糖,血糖值 ≥ 16.7 mmol/L 视为建模成功。过后每 3 d 测血糖 1 次,血糖值 < 16.7 mmol/L 的实验鼠剔除出本实验。

1.3.2 标本采集与处理 SD 大鼠至自然分娩为 21 个完整天数,21 个完整天数未自然分娩的孕鼠用 10% 水合氯醛麻醉后剖宫取出子鼠。将子鼠心脏取出,一半立即液氮保存作为 Western blot 备用,另一半用甲醛溶液保存。

1.3.3 光镜观察心肌改变 子鼠心肌组织在 10% 福尔马林固定后石蜡包埋,4 μm 切片,行 HE 染色,光镜下观察组织病理改变。

1.3.4 免疫组化观察蛋白表达 将包埋子鼠心肌标本的石蜡做连续切片,按 SP 法免疫组化试剂盒说明完成后续操作,DAB 显色,自来水冲洗;苏木精复染,脱水透明、封片后光镜下镜检。同时以 PBS 缓冲液替换一抗作为阴性对照。

1.3.5 Western blot 检测蛋白表达 取 100 mg 心脏组织标本置于研钵,在液氮中充分研磨至粉末状,加入蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂,离心后取上清液,Bradford 法测蛋白质浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳后行 Western blot。各组蛋白条带的灰度值除以相应 GAPDH 内参校正值为蛋白相对表达水平数值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 孕鼠造模前后血糖比较 5 组孕鼠干预前血糖值两两组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);干预前后组内比较:正常对照组干预前后血糖值的改变差异无统计学意义($P > 0.05$),除正常对照组,其余 4 组干预后比干预前血糖明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);干预后两两组间比较:除正常组外,4 个组血糖值两两组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),4 个组分别与正常对照组两两比较,血糖值均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表1 孕鼠干预前后血糖比较(mmol/L $n=8$ $\bar{x} \pm s$)

组别	STZ 干预前血糖	STZ 干预后血糖
正常对照	5.46 \pm 0.38	5.25 \pm 0.42
模型	5.32 \pm 0.47	26.00 \pm 2.00* #
FA 3rd	5.38 \pm 0.31	25.74 \pm 2.29* #
FA 7rd	5.53 \pm 0.42	27.80 \pm 4.08* #
FA 15rd	5.28 \pm 0.35	27.31 \pm 3.98* #

与同组干预前比较: * $P < 0.05$; 与正常对照组比较: # $P < 0.05$

2.2 子鼠心肌病理改变 光镜下可见 STZ 干预组的新生鼠心肌出现淋巴细胞浸润,与正常对照组比较可见心肌排列疏松程度高,部分区域可见心肌排列紊乱、断裂,甚至可见无结构区域。部分细胞结构不清,出现明显水肿、坏死。

2.3 免疫组化法检测 GATA4、Nkx2.5 蛋白定位表达 GATA4 及 Nkx2.5 免疫组化染色阳性反应均呈棕黄色或棕褐色,定位于细胞核内,且在心肌中表达分布不均匀。在不同组的心房肌、心室肌、室间隔肌均可见表达。另外,在瓣膜中可见 GATA4 明显表

达,但 Nkx2.5 则未见明显表达。见图 1。

2.4 Western blot 法检测 GATA4、Nkx2.5 蛋白的表达 5 组间单因素方差分析,差异有统计学意义。GATA4 各组间比较($F = 13.722$, $P = 0.000$),差异均有统计学意义, Nkx2.5 各组间比较($F = 16.110$, $P = 0.000$)。进一步两两比较,与正常对照组比较, STZ 干预组 GATA4 及 Nkx2.5 蛋白的表达水平均下调,差异有统计学意义($P < 0.05$), FA3rd 组及 FA7th 组的蛋白表达水平均显著高于模型组($P < 0.05$),且 FA3rd 组的蛋白上调程度高于 FA7th 组($P < 0.05$), FA15th 组与模型组蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2、表 2。

3 讨论

对国内北方孕妇人群的研究^[6]提示:孕期体重指数(body mass index ,BMI) 过高可以使妊娠期糖尿病的风险明显增加。糖尿病孕妇产子代出现先天性心

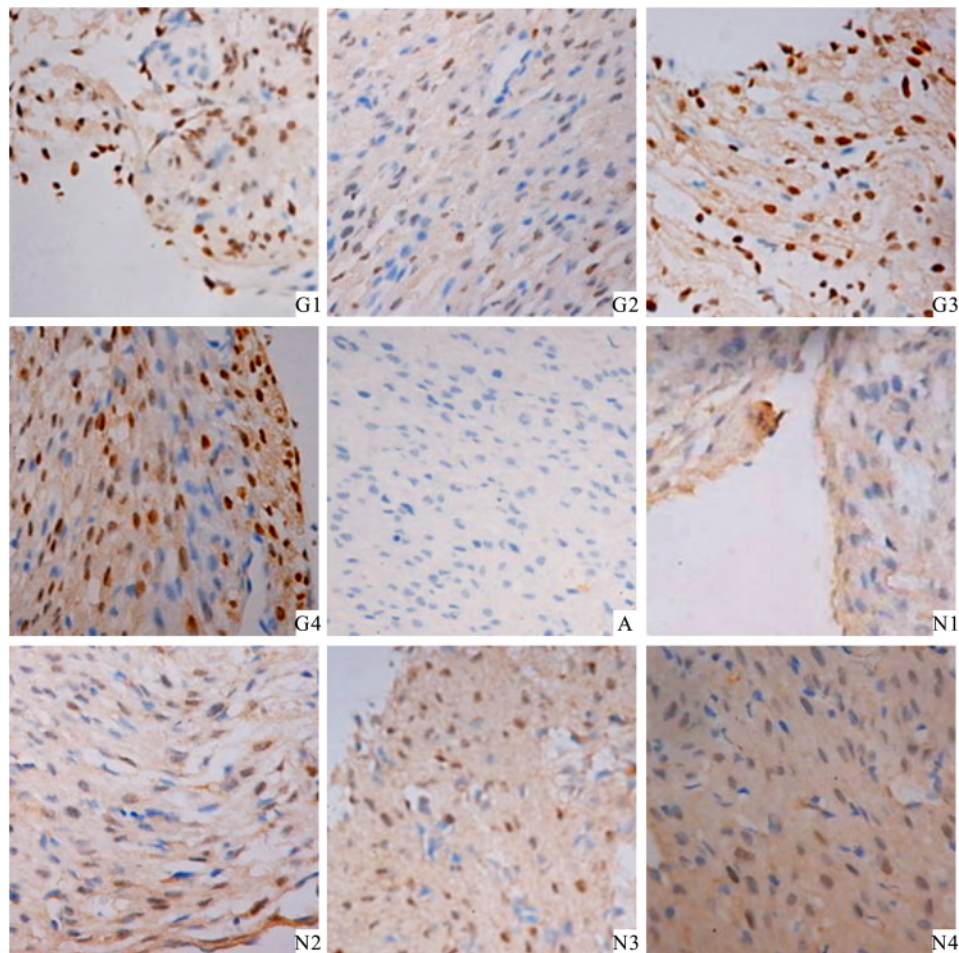


图1 GATA4 及 Nkx2.5 在新生鼠心肌中的表达与定位 DAB $\times 400$

G1、G2、G3、G4 依次为 GATA4 在瓣膜、室间隔、心房肌、心室肌的组织定位; A: 心肌阴性对照; N1、N2、N3、N4 依次为 Nkx2.5 在瓣膜、室间隔、心房肌、心室肌的组织定位

表2 各组新生鼠心肌 GATA4、Nkx2.5 蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

蛋白	正常对照组	模型组	FA3rd 组	FA7th 组	FA15th 组
GATA4	1.797 ± 0.647	0.287 ± 0.072	0.845 ± 0.006 [*] #	0.501 ± 0.117 [*] #Δ	0.274 ± 0.052 [*]
Nkx2.5	0.132 ± 0.040	0.024 ± 0.005	0.072 ± 0.013 [*] #	0.049 ± 0.028 [*] #Δ	0.022 ± 0.006 [*]

与正常对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与 FA3rd 组比较: ^Δ $P < 0.05$

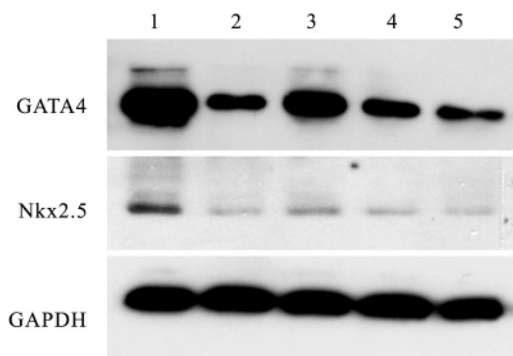


图2 各组新生鼠心肌 GATA4、Nkx2.5 蛋白表达水平
1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: FA3rd 组; 4: FA7th 组; 5: FA15th 组

脏发育异常的可能性增加,并且形式复杂,如换位大动脉转位、永存动脉干、单心室等都可能出现^[7]。同时,肥胖也可能增加子代出现先天性心脏缺陷的概率,且其关联强度随母亲 BMI 增加^[8-9]。孕妇高血糖状态使子代出现先天性心血管缺陷风险升高,但是具体的机制仍不清楚。

GATA 是锌指蛋白转录因子中的一类,其中 GATA4 对哺乳动物心脏发育起至关重要的作用,该基因缺失可致小鼠的心脏出现发育缺陷,胚胎可在第 8.5 ~ 10.5 天死亡^[10]。Nkx2.5 是所有脊椎动物心脏发生、发育最早表达的转录因子。动物模型中, Nkx2.5 的完全缺失导致胚胎死亡及心脏形态发育异常^[11]。而人类 Nkx2.5 基因的突变将导致法洛四联症、室间隔缺损及特发性房室传导阻滞等先天性心脏异常出现^[12]。转录因子 Nkx2.5 及 GATA4 可能存在着协同作用: GATA4 存在 Nkx2.5 的结合位点,这对心脏发生、发育的启动子的特异表达有着重要意义^[13]。

免疫组化染色的定位显示, GATA4 及 Nkx2.5 参与了心脏中不同部位的发育,在各组的心房、心室、室间隔等部位均可观察到相关蛋白的表达; Western blot 法为蛋白半定量检测的经典方法,与免疫组化法应用在蛋白半定量检测时易受主观因素影响的不足互补。GATA4、Nkx2.5 在心肌各部位分布不均,考虑到分部位精确完整取样难度大及单独取样后组织质量小,对后期研磨组织、定量等可能存在取样、操作上造成结果的误差。参考相关文献^[8],

取相同部位心脏组织 100 mg 作为 Western blot 实验样品观察心脏蛋白表达差异,而不行单独部位间的蛋白差异分析。Western blot 的蛋白半定量检测显示,与正常对照组比较, STZ 干预组 GATA4 及 Nkx2.5 的蛋白表达水平均呈下调趋势,提示孕鼠高血糖状态可影响心脏发育,使子代心脏发育关键因子 GATA4、Nkx2.5 蛋白表达减少,这与 Kobayashi et al^[2]的体外心肌细胞实验结果吻合。蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者, GATA4、Nkx2.5 蛋白表达下调可能是导致子鼠心肌的发育异常的机制之一。

叶酸主要的作用是提供甲基及参与 DNA 等的合成,而 Matté et al^[14]的研究提示,叶酸可能还有间接抗氧化和维持 DNA 稳定性的作用。叶酸对预防先天性心脏病的积极作用已得到较广泛认可,但具体机制仍未阐明。对实验中叶酸干预时间分点的观察,可见服用叶酸后 GATA4、Nkx2.5 蛋白表达水平上调。从维持、提高心肌 GATA4、Nkx2.5 蛋白表达水平这点来说,叶酸的保护作用在孕鼠高血糖这一特定危险因素持续出现时依然存在,并且出现怀孕后开始服用叶酸的时间越早保护作用越强的趋势。然而,即便是怀孕早期已开始服用叶酸干预,蛋白表达依旧未能达到正常对照组的水平,表明尽管叶酸对孕鼠高血糖状态中子鼠的心肌有一定保护作用,但仍无法完全消除高血糖对子代心脏发育的不良影响。

参考文献

- [1] 仇小强,钟秋安,曾小云. 孕期环境暴露因素与先天性心脏病关系[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(5): 601-2.
- [2] Kobayashi S, Mao K, Zheng H, et al. Diminished GATA4 protein levels contribute to hyperglycemia-induced cardiomyocyte injury[J]. J Biol Chem, 2007, 282(30): 21945-52.
- [3] 梁进涛. 高糖对斑马鱼胚胎心脏发育的影响及机制研究[D]. 复旦大学, 2010.
- [4] Corrigan N, Brazil D P, McAuliffe F. Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009, 85(6): 523-30.
- [5] 厉传琳,何达,谷茜,等. 先天性心脏病发生原因的循证研究[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(23): 3655-9.

- [6] 刘学敏,陈震宇,王桂喜,等. 孕前体重指数及其孕期增加对妊娠结局的影响[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(22): 3084 – 7.
- [7] Lisowski L A, Verheijen P M, Copel J A, et al. Congenital heart disease in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus [J]. *Herz*, 2010, 35(1): 19 – 26.
- [8] 刘伟,陶芳标,汪思应,等. Nkx2.5 基因在孕鼠肥胖致胚胎心脏畸形中的表达及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(1): 16 – 20.
- [9] Madsen N L, Schwartz S M, Lewin M B, et al. Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: a population-based study[J]. *Congenital Heart Dis*, 2013, 8(2): 131 – 41.
- [10] Kuo C T, Morrissey E E, Anandappa R, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(8): 1048 – 60.
- [11] Lyons I, Parsons L M, Hartley L, et al. Myogenic and morphogenic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2.5 [J]. *Genes Dev*, 1995, 9(13): 1654 – 66.
- [12] Benson D W, Silberbach G M, Kavanaugh-McHugh A, et al. Mutations in the cardiac transcription factor Nkx2.5 affect diverse cardiac developmental pathways[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(11): 1567 – 73.
- [13] Molkentin J D, Antos C, Mercer B, et al. Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart[J]. *Dev Biol*, 2000, 217(2): 301 – 9.
- [14] Matté C, Mackedanz V, Stefanello F M, et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid[J]. *Neurochemistry Int* 2009, 54(1): 7 – 13.

Influence of folic acid on heart development-related proteins in offspring of maternal hyperglycemia rats during pregnancy

Zhan Yike¹, Qiu Xiaoqiang², Ma Ruojia¹

(¹Dept of Cardiovasology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001;

²School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021)

Abstract Objective To investigate the effects of oral folic acid supplementation on the expressions of heart development-related proteins GATA4 and Nkx2.5 of offspring in the rat models of maternal hyperglycemia during pregnancy. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats in pregnancy were randomly divided into 5 groups: control group, models group, FA3rd group, FA7th group and FA15th group. Except for the control group, maternal hyperglycemia was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (38 mg/kg) in SD rats of four other groups on the first day of pregnancy. And group FA3rd, FA7th, FA15th were intragastriced with folic acid (0.8 mg/kg per day) from day 3, 7, and 15 of pregnancy respectively until the end of the pregnancy. The hearts of neonates were taken on the 21st day of pregnancy and the heart tissues with haematoxylin and eosin staining were observed. The expressions of GATA4 and Nkx2.5 proteins were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** The blood glucose level of pregnant rats intervened by streptozotocin was significantly increased ($P < 0.05$) and in a part of their offspring the cardiac injury was detected. GATA4 protein was expressed in atria, ventricles, interventricular septum and valvular tissues. Nkx2.5 protein was expressed in atria, ventricles and interventricular septum, while it was not expressed obviously in valvular tissues. The expression levels of GATA4 and Nkx2.5 were decreased in the groups intervened by streptozotocin compared with the control group ($P < 0.05$). The expression levels of GATA4 and Nkx2.5 in FA3rd group and FA7th group were higher than that of the models group ($P < 0.05$). Compared with FA7th group, the expression of GATA4 and Nkx2.5 in FA3rd group increased greatly ($P < 0.05$). However, it showed no significant difference between the models group and FA15th group. **Conclusion** Maternal hyperglycemia during pregnancy may result in offspring's cardiac injury and decrease their expressions of heart development-related protein GATA4 and Nkx2.5 at the same time. Folic acid supplementation may increase the expressions of GATA4 and Nkx2.5 protein and has a protective effect on offspring's myocardial development of maternal hyperglycemia in pregnancy.

Key words folic acid; heart development-related; offspring; maternal hyperglycemia