

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.002

文章编号: 1005-8982(2017)24-0007-04

自发性高血压大鼠心肾交感神经的分布状况*

郭建强¹, 孙鹏², 李素娟³, 赵鹏伟², 牛燕², 张焯²

(1. 内蒙古医科大学附属医院 心内科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学微生物与免疫实验中心, 内蒙古 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古医科大学附属医院消化内科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

摘要:目的 探讨自发性高血压大鼠心脏及肾脏交感神经的分布状况。**方法** 选取 6 及 12 周龄的自发性高血压大鼠(SHR)和相应周龄的同源正常血压大鼠(WKY),以儿茶酚胺合成限速酶酪氨酸羟化酶(TH)的表达作为交感神经分布的标志,采用免疫组织化学检测 TH,尾套法检测大鼠血压及心率。**结果** 6 及 12 周龄的 SHR 血压及心率高于相应周龄的 WKY 鼠。6 及 12 周龄的 SHR 心脏及肾脏 TH 的表达高于相应周龄的 WKY 鼠。SHR 12 周龄时肾脏 TH 的表达高于 6 周龄,心脏 TH 的表达在 2 个周龄组差异无统计学意义。**结论** SHR 心脏及肾脏交感神经纤维分布密度增加,并且随着高血压的进展,肾脏交感神经纤维分布密度有增加的趋势。

关键词: 高血压;交感神经;心脏;肾脏

中图分类号: R544

文献标识码: A

Distribution of heart and kidney sympathetic nerves in spontaneous hypertension rats*

Jian-qiang Guo¹, Peng Sun², Su-juan Li³, Peng-wei Zhao², Yan Niu², Xuan Zhang²

(1. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 2. Department of Experiment Center for Microbiology and Immunology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China; 3. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010050, China)

Abstract: Objective To investigate the cardiac and nephrological distribution of sympathetic nerves in spontaneous hypertension rats (SHR). **Methods** Heart and liver tissues were harvested from 6-week and 12-week old SHR and homogenous Wistar-Kyoto rats (WKY). Immunohistochemistry staining of Tyrosine hydroxylase (TH), a catecholamine synthesis rate-limiting enzyme, was performed as an indication of sympathetic nerves. Blood pressure and heart rate were measured by tail-cuff method. **Results** Both blood pressure and heart rate of 6-week and 12-week old SHR were significantly increased compared with those of WKY. Expression levels of TH in heart and kidney of 6-week and 12-week old SHR were significantly higher than those of WKY. In SHR groups, TH expression in kidney of 12-week upregulated significantly when compared with that of the 6-week group, while there was no difference in terms of hepatic TH between 6-week and 12-week old ones. **Conclusion** The density of sympathetic nerves is much higher in SHR than that in WKY; nephrological sympathetic nerves were increased in time-dependent manner alongside the progression of hypertension.

Keywords: hypertension; sympathetic neural; heart; renal

交感神经的活化是高血压的一个主要发病机制, 但早年认为交感神经主要在血压的短期调节中发挥

收稿日期: 2017-01-23

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金博士基金(No: 2014BS0806)

作用,在长期的血压调整及高血压的发展中其发挥的作用有限。随着研究的深入及方法学的改进,发现交感神经的活化在高血压的形成过程中一直发挥很大的作用^[1]。常规的心率和血尿中儿茶酚胺及其代谢产物是交感神经活化的功能学表现^[2],而组织交感神经分布是交感神经状态的解剖学基础^[3]。本文拟探讨高血压时心脏及肾脏交感神经分布状况。采用自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat,SHR)模型,检测心脏及肾脏的交感神经分布。SHR 在 12 周左右血压已稳定升高,进入成熟期,因此选择 6 及 12 周龄的 SHR 进行研究^[4]。以儿茶酚胺合成限速酶酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)作为交感神经分布的标志^[5]。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

6 和 12 周龄的雄性 SHR 及相应的正常血压大鼠(wistar kgoto rat,WKY)(购于北京维通利华公司),抗酪氨酸羟化酶一抗(ab41528)(购自英国 Ab-com 公司),免疫组织化学其他相关试剂[包括山羊血清封闭液、加生物素标记的羊抗兔 IgG、亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(avidin-biotin-peroxidase complex method,ABC)法染色试剂、DAB 显色试剂(购自福州迈新生物技术开发有限公司)]。动物实验方案或内蒙古医科大学实验动物伦理委员会批准并遵守相关规定实施。

1.2 血压及心率检测

大鼠的血压及心率测量采用 BP-98A 测量仪(北京软隆生物技术有限公司)检测,具体操作根据其产品说明书进行。将大鼠置于安静、温暖的环境,适应 30 min 后将大鼠放在鼠袋中,保持恒温,然后将感应器置于老鼠的尾根部,按下开始键,BP-98A 自动监测老鼠尾部的血流脉动,当判定脉波稳定时,自动开始测量,从测压仪上读取收缩压、舒张压、平均动脉压及心率数据,连测 5 次,取其平均值。分别测

量 6 及 12 周龄的 WKY 和 SHR 的血压及心率。

1.3 心、肾交感神经分布测定

交感神经纤维为 TH 阳性纤维。通过免疫组织化学的方法半定量分析 TH 表达。测量 6 及 12 周龄大鼠的 TH 表达。脊椎脱臼法处死大鼠,甲醛心脏灌注处理后,将心、肾组织标本固定于甲醛,常规石蜡包埋,切片为 4 μ m 厚,并常规脱蜡,pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)清洗 5 min,共清洗 3 次后,用 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液微波煮沸修复抗原 5 min,PBS 清洗 3 次,用 3%过氧化氢 H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 15 min,PBS 清洗 3 次,山羊血清封闭液孵育 1 h,消除非特异性染色,吸水纸延边吸去血清,加兔抗人 TH 抗体,4℃孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,加生物素标记的羊抗兔 IgG,37℃作用 1 h 后。PBS 清洗 3 次,加入 ABC 过氧化物酶复合物室温作用 1 h,然后 DAB 显色 5 min,苏木精染色。中性树脂胶封固,镜检。采用平均光密度(mean optical density,MOD)值分析 TH 的表达量。选择左心室间隔部心肌与肾皮质与髓质交界处组织切片,每只大鼠心脏及肾脏切片各 3 张。每张切片随机分析 6 个高倍镜视野($\times 200$),采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测量 TH 表达的 MOD。MOD=积分光密度值(integrated optical density,IOD)/所测量的面积。6 个视野 MOD 的平均值作为该切片的 MOD 值,3 张切片的平均 MOD 值作为该只大鼠的 TH 蛋白表达水平^[6]。色调(H)、饱和度(S)、亮度(I)所选择的参数分别为 12~40、0~255、0~188。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验进行分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SHR 和WKY 的血压和心率比较

6 及 12 周龄的 SHR 收缩压及舒张压均高于相

表 1 两组大鼠 6 和 12 周龄收缩压、舒张压的比较 ($n=5$,mmHg, $\bar{x}\pm s$)

组别	收缩压				舒张压			
	6 周	12 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	6 周	12 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
WKY 组	118.6 \pm 9.8	123.4 \pm 6.9	-0.897	0.396	86.2 \pm 8.7	90.4 \pm 9.8	-0.719	0.492
SHR 组	147.8 \pm 8.2	194.0 \pm 13.5	-6.531	0.000	107.8 \pm 5.6	153.6 \pm 11.7	-7.901	0.000
<i>t</i> 值	-5.114	-10.403			-4.671	-9.286		
<i>P</i> 值	0.001	0.000			0.002	0.000		

应周龄的 WKY。随着周龄的增长,SHR 的血压逐渐升高,从 6 周龄的(147.8 ± 8.2)/(107.8 ± 5.6)mmHg 升高到 12 周龄(194.0 ± 13.5)/(153.6 ± 11.7)mmHg ($P < 0.05$),而 WKY 的血压则保持不变,6 周龄组为(118.6 ± 9.8)/(86.2 ± 8.7)mmHg,12 周龄组为(123.4 ± 6.9)/(90.4 ± 9.8)mmHg($P > 0.05$)(见表 1)。6 和 12 周龄的 SHR 心率均快于相应周龄的 WKY。见表 2。

表 2 两组大鼠 6 和 12 周龄心率的比较
($n=5$,次/min, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 周	12 周
WKY 组	365 ± 21	327 ± 22
SHR 组	414 ± 26	398 ± 27
<i>t</i> 值	-3.290	-4.601
<i>P</i> 值	0.011	0.002

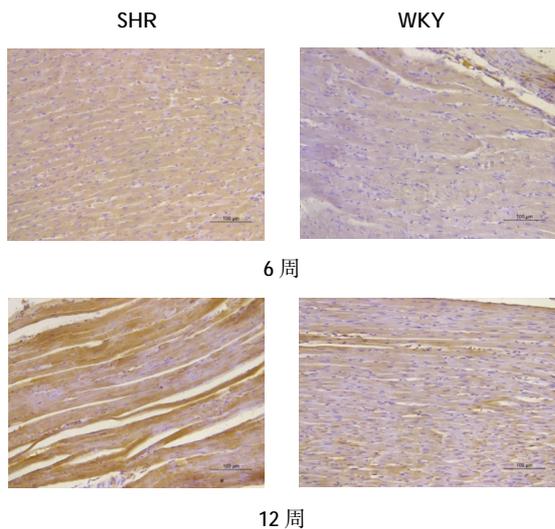


图 1 两组大鼠 6 和 12 周龄心脏 TH 表达 (×200)

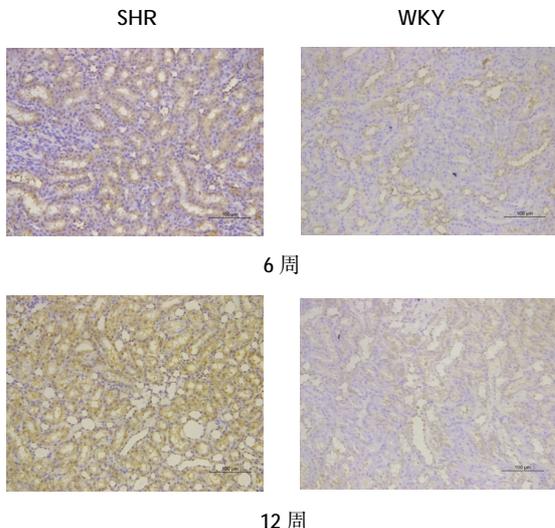


图 2 两组大鼠 6 和 12 周龄肾脏 TH 表达 (×200)

2.2 SHR 和 WKY 心脏、肾脏的 TH 表达水平

6 及 12 周龄的 SHR 心脏及肾脏的 TH 表达水平高于相应的 WKY;12 周龄 SHR 肾脏 TH 的表达水平高于 6 周龄;6 和 12 周龄 SHR 心脏 TH 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、2 和表 3、4。

表 3 两组大鼠 6 和 12 周龄心脏 TH 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	6 周	12 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
WKY 组	0.78 ± 0.08	0.89 ± 0.09	-1.899	0.094
SHR 组	5.36 ± 0.82	5.06 ± 0.76	0.606	0.561
<i>t</i> 值	-12.378	-12.127		
<i>P</i> 值	0.000	0.000		

表 4 两组大鼠 6 和 12 周龄肾脏 TH 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	6 周	12 周	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
WKY 组	0.37 ± 0.10	0.41 ± 0.08	-0.853	0.418
SHR 组	0.81 ± 0.27	1.82 ± 0.25	-6.068	0.000
<i>t</i> 值	-3.439	-11.586		
<i>P</i> 值	0.009	0.000		

3 讨论

高血压是最常见的心血管疾病,是心脑血管病严重事件(心肌梗死和脑血管意外)的最重要的危险因素。静息心率和心输出量是评价交感神经活性的间接指标,研究表明,在年轻的高血压患者中,静息心率及心输出量均有增加。肾上腺素能受体的多态性与高血压有着密切的关系^[7]。去甲肾上腺素由交感神经节后神经元末梢释放,是交感神经系统主要的效应分子,其浓度的升高是交感神经活化的标志,高血压患者的血浆及尿液中的去甲肾上腺素水平也有增加^[8]。近年来有关新的评价交感神经活性的方法,比如肌肉交感神经活力检测,放射性标记的去甲肾上腺素溢出率,能够更加准确的检测交感神经的活性,在高血压患者中,该指标均出现异常,进一步明确交感神经系统在高血压发病过程中的重要作用^[2-3]。

近年来,国内外相继开展心血管疾病中神经分布异常的研究,发现组织中的神经失分布、再生和过度分布现象,初步确立交感神经分布异常是交感神经活性的解剖学基础,是交感神经活性最根本的决定因素,目前基础研究常用测定去甲肾上腺素含量、儿茶酚胺组织荧光、抗酪氨酸羟化酶的免疫组织化学法检测组织中的交感神经分布,其中抗酪氨酸羟化酶 TH 的免疫组织化学染色直接地检测组织中的交感

神经分布^[9]。TH 是儿茶酚胺合成的限速酶,抗 TH 的免疫组织化学染色方法检测交感神经分布已被认为较其他方法更为准确客观,是动物实验及尸检中检测交感神经分布,分析交感神经活性的主要方法^[3]。

本研究观察自发性高血压大鼠不仅血压、心率高于正常对照组,心脏和肾脏交感神经的分布都比正常组有增加,表明交感神经激活是高血压的重要发病机制,并且存在交感神经过度分布这一交感神经激活的解剖学基础。另外,笔者观察到,随着高血压的不断进展,肾交感神经分布增强,但心脏交感神经并未呈现增强的趋势,说明肾脏交感神经的活化可能是高血压进展的主导因素。这也与近年来的临床研究结果相符合,即经皮导管肾动脉射频消融去神经术治疗难治性高血压所展示出一定的有效性^[10-11]。郭运忠等研究表明,给 SHR 行去肾交感神经术在降低血压的同时可导致肾脏 TH 的表达降低^[12]。本研究也印证交感神经的过度分布在高血压发病中的重要作用,本研究的结论进一步丰富该理论,为高血压的防治提供部分理论依据。

综上所述,交感神经激活是高血压的重要发病机制,高血压时心脏及肾脏交感神经纤维分布密度明显增加,并且随高血压的进展,尤其肾脏有逐渐加重的趋势,是高血压交感神经活化的解剖学基础。

参 考 文 献:

- [1] HART E C, CHARKOUDIAN N. Sympathetic neural mechanisms in human blood pressure regulation[J]. *Current Hypertension Re-*
- ports, 2011, 13(3): 237-243.
- [2] GRASSI G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives[J]. *Hypertension*, 2009, 54(4): 690-697.
- [3] BURGI K, CAVALLERI M T, ALVES A S, et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300(2): 264-271.
- [4] 高婷, 刘健, 樊小农, 等. 自发性高血压大鼠模型的应用概况[J]. *实验动物科学*, 2013, 30(6): 57-60.
- [5] 张赫楠, 李平, 白芳芳, 等. 酪氨酸羟化酶的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(5): 449-451.
- [6] 张立霞, 王春燕, 王秀文. Image-Pro Plus 图像分析软件在免疫组织化学定量分析中的基本应用 [J]. *滨州医学院学报*, 2014, (4): 313-314.
- [7] 许建新, 李宏伟, 杨春菊, 等. 中国人群 $\beta 3$ 肾上腺素能受体基因 Trp64Arg 多态性与原发性高血压关联的荟萃分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(13): 78-82.
- [8] MANCIA G, GRASSI G. The autonomic nervous system and hypertension[J]. *Circulation Research*, 2014, 114(11): 1804-1814.
- [9] 孙宁玲. 高血压治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 17-21.
- [10] ESLER M D, BÖHM M, SIEVERT H, et al. Catheter-based renal denervation for treatment of patients with treatment-resistant hypertension: 36 month results from the SYMPLICITY HTN-2 randomized clinical trial[J]. *European Heart Journal*, 2014, 35(26): 1752-1759.
- [11] BÖHM M, MAHFOUD F, UKENA C, et al: First report of the global SYMPLICITY registry on the effect of renal artery denervation in patients with uncontrolled hypertension[J]. *Hypertension*, 2015, 65(4): 766-774.
- [12] 郭运忠, 李禄洪, 谭丽华, 等. 去肾交感神经术对自发性高血压大鼠肾胺酶及酪氨酸羟化酶的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2012, 37(8): 829-833.

(王荣兵 编辑)