



石丽君

心脑血管调控机制的早期 功能发育研究

Study on the Early Functional Development of the
Cardio Cerebrovascular Regulation Mechanisms

北京体育大学出版社
Beijing Sport University Press

心脑血管调控机制 的早期功能发育研究

**Study on the Early Functional Development of the
Cardio Cerebrovascular Regulation Mechanisms**

石丽君 著
Shi Li Jun

北京体育大学出版社
Beijing Sport University Press

责任编辑：刘玖占
审稿编辑：熊西北
选题策划：李 建
责任校对：刘亦飞
责任印制：陈 莎

图书在版编目（CIP）数据

心脑血管调控机制的早期功能发育研究 / 石丽君著. — 北京：
北京体育大学出版社, 2011.6

ISBN 978-7-5644-0727-8

I. ①心… II. ①石… III. ①心脏血管疾病—防治②
脑血管疾病—防治 IV. ①R54②R743

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第118163号

心脑血管调控机制的早期功能发育研究

石丽君 著

出 版：北京体育大学出版社
地 址：北京市海淀区信息路48号
邮 编：100084
邮购部：北京体育大学出版社读者服务部 010-62989432
发行部：010-62989320
网 址：www.bsup.cn
印 刷：北京昌联印刷有限公司
开 本：787×960毫米 1/16
印 张：12

2011年7月第1版第1次印刷

定 价：26.00 元

（本书因装订质量不合格本社发行部负责调换）

中文摘要

心脑血管疾病严重威胁着人类的生命健康，且位居全世界人类致死病因首位。除了遗传和环境因素外，目前认为早期生命发育亦起着重要作用。过去十几年中，“胎源性”或是“发育起源”的成年疾病受到越来越多的关注。随着生活水平的提高和健身意识的增强，人们对妊娠期运动的态度也发生了积极的变化。关于妊娠运动的安全性问题以及妊娠期运动对子代出生前和后的个体健康的影响问题也受到学术界愈来愈多的关注。脑肾素—血管紧张素系统（RAS）和胆碱能系统对胎儿心血管、体液平衡和神经内分泌有着重要的调节作用。本书主要介绍心脑血管调控机制的早期功能发育方面的研究进展，并结合清醒在体动物实验方法和离体研究，介绍脑RAS和胆碱能系统重要组分在出生前的功能发育状况，并探讨脑动脉收缩机制，着重蛋白激酶C调控通路的功能发育。在体研究中，介绍独特的绵羊胎子宫内置管手术模型，即选用不同孕期的绵羊胎儿行子宫内置管手术，包括侧脑室插管、食管平滑肌吞咽电极安装、皮层电极安装、膀胱插管、血管插管等，术后行侧脑室注射，实时监测心血管功能、皮层电图、吞咽及泌尿功能等，并进行血浆神经垂体激素测定和脑*c-fos*表达检测。离体脑血管实验选用绵羊胎儿和成年大脑中动脉进行血管收缩和细胞内钙浓度检测。实验证实，脑内局部RAS和胆碱能系统在出生前已发展到相当的水平，至少在妊娠后1/3阶段已具备功能，可以发挥心血管和体液平衡调控作用；另外，成熟与未成熟的脑动脉平滑肌在收缩机制上存在多处发育学差异。鉴于心脑血管调控机制的发育不仅关系到胎儿，也关系到出生后乃至成年的生命健康，因此对于它们在正常及异常环境下的早期功能发育进行研究对阐明“编程效应”有着重要意义。

ABSTRACT

Cardio cerebrovascular-related diseases are the major threat to the health of people and are the leading cause of death in the world. In addition to the environmental and genetic factors, early life conditions are now also considered important contributing elements to these pathologies. The concept of ‘fetal’ or ‘developmental’ origins of adult diseases has received increased recognition over the last decade. With the improvement of the living standard and the enhancement of the awareness of physical fitness, people’s attitude towards exercise during pregnancy has a positive change. More and more attention has attracted by the security of exercise during pregnancy and the impact of exercise on the prenatal and postnatal health of the offspring. Brain renin-angiotensin system (RAS) and cholinergic system play important roles in the control of fetal cardiovascular responses, body fluid balance, and neuroendocrine regulation. This book focuses on the early functional development studied to date of cardio cerebrovascular regulation mechanisms. Combine the *in vivo* study on conscious animals with the *in vitro* study, we present the progress on the ontogeny of the local RAS and cholinergic system components in the developing brain *in utero* as well as their functional development before birth. Furthermore, we introduce the investigation of the functional development of the protein kinase C in the regulation of cerebral arterial contractility. In *in vivo* study, ovine fetuses were chronically prepared with thyrohyoid, nuchal and thoracic esophagus, and diaphragm electromyogram electrodes, as well as lateral ventricle and vascular catheters. Electrodes

were also implanted on the parietal dura for determination of fetal electrocorticogram (ECoG). After recovery, fetal cardiovascular responses, ECoG, swallowing activity and renal excretion were monitored during basal period and the experimental period following intracerebroventricular injection. Plasma arginine vasopressin and oxytocin concentrations and *c-fos* expression in the brain were examined, too. In *in vitro* vessel study, vascular tension and $[Ca^{2+}]_i$ responses were simultaneously measured in segments of main branch middle cerebral arteries from near-term fetal and nonpregnant female adult sheep. The results indicate that the brain RAS and cholinergic system have developed and are functional at least at the last third of gestation. There are various developmental differences of vasoregulation mechanisms between mature and immature cerebral arteries. Given that the central cardio cerebrovascular regulation mechanisms are important not only to the prenatal but also to the postnatal health, we presumed that studies on the development of these systems in normal and abnormal patterns should shed light on “programming” mechanisms for adult cardio cerebrovascular diseases in fetal origins.

目 录

第一章 概 论	1
第二章 心血管调控机制的早期发育学研究方法	5
第一节 胎羊模型及在体动态功能监测	5
一、实验动物	5
二、手术及术后护理	5
三、生理功能测试	7
四、血浆激素测定	10
五、免疫组化实验	11
六、RT-PCR	12
第二节 脑内神经通路早期功能发育研究方法	12
第三章 肾素-血管紧张素系统的早期发育	17
第一节 胎儿脑RAS的组成	19
一、血管紧张素原	19
二、肾素	19
三、血管紧张素转化酶	20
四、血管紧张肽	20
五、血管紧张素 II 受体	20
第二节 胎儿脑RAS的功能发育（一）—Ang II 受体的早期功能发育	24

一、胎儿脑AT ₁ R和AT ₂ R的发育	24
二、胎儿脑RAS对心血管功能的调节	29
三、胎儿脑RAS对体液平衡的调节	45
四、胎儿脑RAS对神经内分泌的调节	46
第三节 胎儿脑RAS 的功能发育 (二) — ACE的早期功能发育	54
一、胎儿脑内不同区域ACE mRNA检测	55
二、血液指标	56
三、心血管功能	58
四、皮层电活动	59
五、吞咽活动	60
六、血浆AVP和OT	61
七、 <i>c-fos</i> 测定	62
八、分析与讨论	66
第四节 脑RAS与胎源性高血压	72
一、RAS在发育中的作用	72
二、胎源性高血压及脑RAS的异常发育	73
第四章 胆碱能系统的早期发育	75
第一节 外周胆碱能系统的早期发育	75
一、胎儿心血管系统胆碱能系统的发育	75
二、胎儿消化和泌尿系统胆碱能系统的发育	76
第二节 脑胆碱能系统的早期发育	78
一、胎儿脑胆碱能受体的发育	78
二、胎儿脑乙酰胆碱机制与其受体功能发育	80
第五章 脑血管收缩机制的早期发育	90
第一节 血管平滑肌收缩机制概述	90
一、MLCK途径	91

二、PKC途径	93
三、Ang II对血管平滑肌细胞生物学行为的影响	100
第二节 脑动脉平滑肌收缩机制早期功能发育研究方法	103
一、实验动物	103
二、大脑中动脉血管环制备	103
三、血管平滑肌收缩性和细胞内钙浓度测定	104
四、药品	106
五、数据统计分析	107
第三节 脑动脉平滑肌收缩PKC机制的早期功能发育	107
一、KCl诱发的MCA收缩	109
二、PKC激活诱发的MCA收缩	109
三、BK通道在PKC激活诱发的MCA收缩反应中的作用	114
四、K _{ATP} 通道在PKC激活诱发的MCA收缩反应中的作用	118
五、K _v 通道在PKC激活诱发的MCA收缩反应中的作用	121
六、K _{IR} 通道在PKC激活诱发的MCA收缩反应中的作用	123
七、ERK1/2抑制对PDBu诱发的血管收缩和[Ca ²⁺] _i 变化的影响	123
八、ROCK在PKC激活诱发的MCA收缩反应中的作用	124
九、分析与讨论	126
第六章 妊娠运动与胎儿发育	137
第一节 妊娠期运动对胎儿的影响	137
一、妊娠期运动对胎儿生长的影响	138
二、妊娠期运动对子宫血流和胎儿心率的影响	139
三、妊娠期运动对胎儿体温的影响	141
四、妊娠期运动对子代健康影响的研究展望	141
第二节 妊娠期运动对母体的影响	143
一、心血管系统	143

二、呼吸系统	144
三、骨骼肌肉系统	144
四、代谢和内分泌	145
第三节 妊娠期运动的护理指导	145
一、妊娠期运动禁忌证	145
二、妊娠期运动测试	146
三、妊娠期运动时机、方式及运动量的选择	146
四、有氧锻炼的指导意见	146
五、对于怀孕运动员的建议	147
六、结论	148
参考文献	149
后 记	175
附录 I：作者在心脑血管功能发育领域发表的相关文章	177
附录 II：缩略语表	179

第一章 概 论

心脑血管疾病严重危害着人类的生命和健康。据统计,我国每年因心脑血管疾病死亡者占死亡病因的半数左右。欧美日等国家,公众疾病致死原因中心脑血管疾病也位居首位。心脑血管疾病的形式多种多样,其中最常见的是高血压、冠心病和脑卒中。高血压是指血压升高超过该年龄正常血压水平的状况;冠心病主要是指冠状动脉发生粥样硬化,致使动脉变硬变窄,并导致心肌缺血缺氧而引发的心脏病,其主要形式有心绞痛和心肌梗塞;脑卒中俗称中风,则是向脑部供血的脑动脉发生了病变的一种疾病,主要形式有脑梗塞(缺血性脑卒中)和脑部出血(出血性脑卒中)。

心脑血管疾病的病因错综复杂,目前人们已经掌握的罹患心脑血管疾病的危险因素包括吸烟、肥胖、静坐少动的生活方式、高胆固醇血症等。但是,并非所有心脑血管疾病患者都具备这些危险因素,用它们来预测成年心脑血管疾病的能力有限。世界卫生组织(WHO)曾报道这些传统的风险因素只能对25%心脑血管病的死亡做出解释,因而探索和发掘业已存在的未知病因对于心脑血管疾病的早期预防显得尤为关键,它已成为当今生命科学领域的重要研究课题。

上个世纪八十年代,英国南安普顿大学的David Barker教授首次提出了“胎源性成人疾病”学说(也称为“Barker学说”),这为研究心脑血管等慢性疾病的发病机制开启了一个新的窗口,目前这项理论受到越来越多的关注。这一学说认为胎儿在母体内发育的关键时期,子宫内的不良生长环境对个体组织和器官发育会产生“印迹(imprinting)效应”,从而“编程(programming)”某些成年疾病。迄今为止,许多国家的流行病学调查及动物实验已经为其提供了有力的支持。很多威胁人类健康的慢性疾病,如高血压、Ⅱ型糖尿病、冠心病和脑卒中等,都与子宫内营养不良、胎儿时期生长发育迟缓或低体重儿密切相关。

人类在几十年漫长的生命历程中,生长和发育期相对较短,细胞、组织、腺体、器官和系统的发育成熟主要集中在胎儿时期和出生后若干年的生命早期,其中3/4以上的细胞分裂发生在子宫内的胎儿期。从受精到婴儿出生的近十个月中,胎

儿期（从受精卵的第9周至分娩前）约占80%。个体器官形成、功能成熟大多发生在此期，而许多胎源性疾病则可以理解为发育的分支产物。这是因为胎儿期是个体发育的敏感期，此时各种外来刺激将导致胎儿个体特定的发育程序产生永久性改变。在我国每年出生的上千万婴儿中，缺陷儿数目约为80~100万。为此，了解和重视胎儿的发育和生理学，对于优生优育和胎源性慢性心脑血管疾病的防治具有重要意义。

胎儿发育生理学的发展史可追溯到大约100年前。早在1920年，伦敦大学圣玛丽医院Huggett博士就首次发现胎羊动脉血中的氧分压显著低于母羊动脉血中的氧分压水平，成为医学史上第一个对母体和胎儿血氧分压进行研究的科学家。随后，剑桥大学的Barcroft博士在Huggett创立的实验模型基础上，开展了大量有关胎儿发育与生理功能的实验工作，由此开创了胎儿发育生理学这门新学科，并为之奠定了基础。

但是不难发现，在1960年之前，所有关于胎儿发育生理学的动物实验研究都是在麻醉动物身上实施的。其基本的实验模型与Huggett的实验模型相似，即将妊娠动物麻醉后，打开子宫，取出胎儿放在接近体温的氯化钠溶液中，对其进行实验研究。尽管实验中研究人员采取各种方法使动物所处环境尽可能接近其自然生理状态，但毕竟还是存在相当大的差异。后来，超声波诊断被引入临床生殖医学，它开创了胎儿生长发育研究的新局面，无创性的优势使其可以安全地用于人类宫内发育学研究，可以及时了解孕期某个阶段胎儿出现的病理问题。然而，超声波诊断对胎儿的功能发育方面的研究则束手无策。例如，对于宫内胎儿的血压反应状况，血氧和血二氧化碳的代谢状况及体内的激素水平，超声波技术根本无法监测。

那么如何更好地进行早期的功能发育学研究呢？这个问题直到胎羊宫内置管术的建立，才得到比较理想的解决。此技术是由耶鲁大学的Don Barron教授发明的。他对宫内胎羊进行血管插管并留置，待术后恢复后对母羊和胎羊在无麻醉和无应激条件下进行生理功能的动态检测。之后，来自各国的科学家们在此模型基础上又相继发明和发展了一些新的研究技术，使得心血管生理、神经发育生理、内分泌、血液、消化和泌尿功能等早期功能发育研究成为可能。目前这种胎羊实验模型在学术界被广泛认可和接受。无疑，这种在体、清醒、动态生理功能监测方法为早期功能发育学研究做出了卓越贡献。

上个世纪80年代Barker理论的提出为胎儿发育生理学赋予了新的内涵，使其受到越来越多的关注。2003年，美国NIH在亚特兰大召开了“Barker学说”专题

研讨会。近几年来,许多国际著名杂志纷纷以专栏或综述等形式介绍胎源性疾病的研究现况和发展趋势。相比国外的大量细致而深入的研究,我们必须承认我国对胎源性疾病的研究要滞后很多,在目前世界上每年发表的众多胎源性疾病的病因、机制等研究论文中,我国所占的比例极少。然而,我国是人口大国,促进优生优育,增强国民体质是我国的基本国策,提高出生人口素质实际上是提高中华民族素质的前提与根本。随着我国经济快速发展,人们的生存与生活方式产生了巨大的变化,对健康的认识与需求也随之提高。人们越来越多地意识到体质的增强不仅要从出生后做起,胚胎及胎儿时期的正常发育与否也直接关系到个体出生后乃至成年的健康状况,所以体质的根本改善需从子宫内着手进行。近年来,随着生活水平的日益提高,运动已成为许多妇女日常生活的重要组成部分。许多女性希望在妊娠阶段继续或开始从事体育锻炼。虽然运动有利于健康,但是对于妊娠这一特殊时期,运动对孕妇的影响,尤其是运动对子代健康的影响就成为了人们关注的焦点。不当的运动是否会造成胎儿宫内应激,给予代的生命健康产生“印迹效应”,这些问题都需要深入的探索。因此,研究早期功能发育就显得更加重要了。我们不仅要保证孕期母婴生存及健康,更重要的是还要对成年期的疾病和健康负责。

对于早期的发育生理学的研究工作首先是要了解和认识在正常生理条件下,胎儿发育的各个阶段中的功能变化和各系统、器官乃至细胞与分子的正常生理状况。在认识了胎儿正常的独特生理情况后,就有可能对胎儿病理过程加以比较。

在心血管功能调控方面,除了外周机制之外,中枢机制如脑肾素—血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)、脑胆碱能系统等都对心血管和体液平衡有重要的调节功能,而且在细胞生长、组织纤维化等方面也起着关键的作用。了解它们的正常发育状况对于预防RAS相关的和胆碱能相关的胎源性心血管疾病的发生非常重要。另外,血管局部也存在RAS,它在心脑血管疾病的发生中也扮演着重要角色。血管紧张素(angiotensin, Ang) II是一种多功能的血管活性肽,其受体及血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)广泛分布于血管的内皮细胞和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC),血管局部RAS产生的主要活性物质——Ang II通过与其受体结合能够促进血管收缩,发挥局部血管张力和血流量的调节作用。Ang II对VSMC的作用非常复杂,它可以通过不同的信号转导途径影响VSMC的生物学行为。在其短期效应中,蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是其中的一条重要信号转导途径。虽然对血管平滑肌的PKC收缩机制的研究很多,但是对脑血管PKC收缩机制的研究较少,对于脑血

管PKC收缩机制的发育学研究更少。然而，PKC在血管平滑肌收缩中的作用至关重要，它是许多血管激活物包括Ang诱导血管收缩的必经途径。因此，对其收缩机制的研究，以及对比胎儿发育时期和成年脑血管收缩中PKC作用机制的差异，不仅对于了解胎儿脑血管发育生理学，而且对于预防胎源性的脑血管疾病的发生都具有重要意义。

本书中我们从心脑血管调控机制的早期功能发育着手，介绍这种独特的绵羊清醒、在体、动态实验模型，并结合我们近年来的实验结果，对胎儿心脑血管调控机制的RAS和胆碱能系统的功能发育进行介绍。我们的研究目的并非验证“Barker学说”本身，而是为与中枢调控机制相关的心脑血管疾病的宫内起源提供发育学上的依据，期望对胎源性的慢性心脑血管疾病的防治提供基础研究资料，也期望能对妊娠运动对子代健康影响的深入研究提供一点思路。

第二章 心血管调控机制的早期发育学研究方法

胎儿在子宫内的不同发育阶段，对其功能学的研究，以往在人及小动物上，由于没有合适的监测技术，根本无法进行。我们采用怀孕绵羊为实验对象，建立了适合研究目的的胎儿和母亲子宫内置管手术模型，包括股动、静脉插管、侧脑室插管、膀胱插管、食道吞咽电极安装、脑电极安装等，可于清醒、无应激状态下对母体和胎儿的各项功能进行动态监测，这种研究技术目前在国际上也只有为数不多的一些科研单位能够从事，但已成为被学术界认可的、非常有力的胎儿功能发育学研究手段。

第一节 胎羊模型及在体动态功能监测

一、实验动物

一般选用单胎绵羊（总孕程 145 ± 5 天），根据需要选择不同妊娠阶段，饲养于室内研究专用的不锈钢笼中，灯光照明，明暗各12小时。自由饮水、进食，术前一天禁食。所有实验方案均须符合实验动物保护和管理规定并获得许可。

二、手术及术后护理

手术采用严格无菌操作。怀孕母羊肌内注射盐酸氯胺酮（ketamine hydrochloride, 20mg/kg）和硫酸阿托品（50 μ g/kg）进行麻醉诱导，之后气管插管，呼吸机通以1 L/min 氧气和 3% 异氟烷（isoflurane）进行麻醉维持。母羊一侧股动脉和股静脉插管（ID = 1.8mm，OD = 2.3mm），分别至腹主动脉和下腔静脉。

腹部正中切口，暴露子宫。子宫内手术主要分三部分进行，图2-1为胎羊子宫内手术示意图：

(一) 胎羊后肢和腹部手术：选取合适位置，切开子宫，取出胎羊后肢，做一侧股动脉和股静脉插管（ID = 1.0mm，OD = 1.8mm），并放置子宫内导管测定羊水压力；缝合子宫切口；

(二) 胎羊头部手术：再次选取适当位置，切开子宫，暴露胎羊头部。侧脑室插管(18 gauge)，位置：矢状缝旁开1cm，人字缝前0.5cm，硬脑膜下约0.8cm，当进入侧脑室后可见脑脊液流出；颅骨钻于颅骨上打洞，于顶骨硬脑膜安装脑电极，用螺丝固定，用于皮层电图（electrocorticogram, ECoG）的监测；之后将插管和脑电极用牙科水泥固定于颅骨上；缝合子宫（图2-2A）；

(三) 胎羊颈部手术：颈部正中切口，进行吞咽电极安装（型号：AS632，Cooner Wire, Chatsworth, CA）于甲状腺部位，食道平滑肌上、下各安装一对电极，用于监测胎儿肌电图，反映胎羊的吞咽状况。

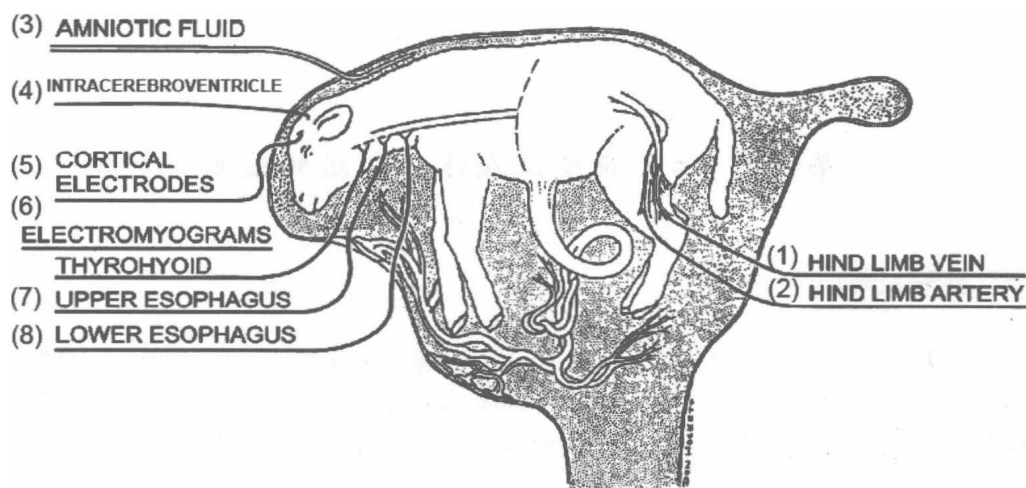


图2-1 子宫内绵羊胎儿插管示意图

(1) 一侧股静脉插管（用于外周给药）；(2) 一侧股动脉插管（用于血压监测、采血）；(3) 羊水插管（监测羊水压力）；(4) 侧脑室插管（用于侧脑室给药）；(5) 脑电极安装（监测皮层电图）；(6-8) 食道平滑肌三对肌电电极安装（监测胎儿吞咽活动）。

所有插管从母羊一侧腹部打洞穿出，置于固定于腹侧的小包内，术后即刻及3-4天内于静脉内给予抗菌素。母羊每日70mg庆大霉素和1g苯甲异噁唑青霉素（新青二），胎羊每日5mg庆大霉素和30mg新青二。术后恢复四至五天，开始测试。

三、生理功能测试

所有实验在动物清醒状态下进行，妊娠母羊静立于笼中，自由饮水进食（图2-2B）。随机分为对照组和实验组，每组n至少为5。实验采取连续监测，一般先记录1h基础状态（-60~0min），然后进行药物干预（静脉注射或侧脑室注射），之后继续记录1.5~2h（0~90或0~120min）。药物剂量根据文献及前期实验选定。

胎儿体重根据公式推测（Robillard et al., 1979）：

$$\text{胎儿体重(kg)} = 0.0961 \times \text{妊娠天数} - 9.228$$

实验中，采用生理记录系统连续监测母亲、胎儿的收缩压和舒张压，羊水压力和心率采样频率为500 Hz（图2-3）。胎儿平均动脉压（mean arterial pressure, MAP）由羊膜腔压力校准。于不同时间点（如-30min、0min、15min、30min、60min、90min）分别由母亲和胎儿的股动脉插管采血约3.5ml。取0.5ml用于测定PO₂、PCO₂、血红蛋白（hemoglobin, Hb）及pH，仪器为Nova analyzer（Nova Biochemical, Model pHox Plus L, Waltham, MA），校正于绵羊深部温度39°C。剩余血液低温离心，分离出血浆，除用于血浆渗透压和电解质浓度的测定外，均于-20°C冻存，以便用于血浆激素测定。所采胎儿血液用等量滤过后母亲血液（测试前抽取）替代，所采母亲血液用等量生理盐水替代。