

转化生长因子 $\beta 1$ 在应激性高血压大鼠体内的表达研究

李小京 陶茂琰 杨晓莉

南昌大学抚州医学院 江西 抚州 344000

【摘要】目的: 探讨转化生长因子 $\beta 1$ 在应激性高血压大鼠体内的表达水平。**方法:** 每天束缚大鼠 3h, 建立慢性束缚模型, 分别在第 6 天、第 13 天和第 20 天测量血压, 筛选出应激性高血压大鼠。在第 7 天、第 14 天和第 21 天采集样本, 酶联免疫 Elisa 法检测生长转化因子 TGF- $\beta 1$ 在大鼠血清中的表达水平; RT-qPCR 检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达; Western blot 检测大鼠心肌组织中 TGF- $\beta 1$ 的蛋白表达水平。**结果:** 慢性束缚应激后, 大鼠的血压明显增加 ($P < 0.05$), 生长转化因子 TGF- $\beta 1$ 在应激性高血压大鼠血清中的表达水平明显增高 ($P < 0.05$), 生长转化因子 TGF- $\beta 1$ 在应激性高血压大鼠左心室心肌组织中的表达水平明显增高 ($P < 0.05$)。**结论:** 慢性束缚应激可使得大鼠血压升高, 并与生长转化因子 TGF- $\beta 1$ 的高表达有密切联系。

【关键词】 应激性高血压; 生长转化因子 TGF- $\beta 1$; 慢性束缚; 大鼠

【中图分类号】 R544.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 2096-1685(2021)50-179-02

应激是机体在受到应激源的强烈刺激后, 做出的非特异性反应, 出现全身的适应性综合征。由于经济的发展和社会的进步, 现代社会对于人类施加的压力越来越大, 由应激所带来的各种疾病也受到普遍的关注和研究。本项目建立慢性束缚应激模型, 这种状态类似于现实生活中人类的慢性应激, 前期研究显示慢性应激可导致血压升高, 出现应激性高血压^[1]。生长转化因子 TGF- β 是分泌型多肽信号分子, 目前 TGF- β 共发现了 5 种亚型, 在哺乳动物体内发现三种: TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 和 TGF- $\beta 3$, 其中 TGF- $\beta 1$ 亚型是功能最为强大且分布最为广泛的一种。既往的研究显示, 原发性高血压患者血清中 TGF- $\beta 1$ 水平显著升高, 另外, TGF- $\beta 1$ 可导致左心室心肌纤维化, 并在多种心血管系统的疾病病变中发挥重要的生物学效应^[2]。本研究旨在分析慢性束缚应激性高血压大鼠血清和左心室心肌组织中 TGF- $\beta 1$ 表达情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只, 束缚前质量 (230 ± 20) g, 8~9 周龄, 由南昌大学实验动物中心提供。动物无创血压测试仪 (成都泰盟科技, BP-6), 实时定量 PCR 扩增仪 (美国 ABI stepone plus), 电泳、转膜印迹系统和凝胶成像仪 (上海天能 VE180+VE186)。TGF- $\beta 1$ ELISA 试剂盒 (美国的 R&D Systems 公司)、荧光实时定量 PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)、RIPA 蛋白裂解试剂盒 (上海 Beyotime 公司)、ECL 试剂盒 (沈阳万类生物科技公司)、鼠抗 TGF- $\beta 1$ 、 β -actin 抗体和羊抗鼠二抗 (美国 Bioss 公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 慢性束缚模型的建立 SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只, 将动物随机分组, 正常对照组 18 只, 束缚应激组 30 只。分别在第 7 天、第 14 天和第 21 天取血取材, 分别设为束缚 7d 组, 束缚 14d 组和束缚 21d 组。其中, 对照组每个时间点各 6 只, 束缚应激组每个时间点各 10 只。用矿泉水瓶改造自制束缚圆筒, 圆筒长 15cm, 直径 7cm, 并在圆筒上下隔开数个小孔, 保证其呼吸顺畅。每天 18:00 - 21:00, 将大鼠束缚于圆筒中, 期间禁水禁食, 其余时间自由取食。非束缚组动物自由取食, 不施加任何刺激。

1.2.2 血压的测量 大鼠在采集血样的前一天, 即第 6 天、

第 13 天和第 20 天测量血压, 检测时间固定在上午。在测量血压前, 大鼠置于动物无创血压测量仪中预热 15min 左右 (温度 40℃), 待动物熟悉环境, 情绪稳定后进行测量。血压测定方法为气囊加压式, 在大鼠尾部套上压敏传感器, 通过微动脉测量收缩压 (Systolic Blood Pressure, SBP) 和舒张压 (Diastolic Blood Pressure, DBP)。每只大鼠测 3 次, 每隔 5min 测一次, 血压值取 3 次测量的平均值。以 SD 大鼠收缩压 (SBP) ≥ 150 mm Hg 为满足实验要求, 筛选出慢性应激性高血压大鼠。

1.2.3 取材及标本处理 血液样本的采集固定在实验开始的第 7 天、第 14 天和第 21 天, 早上进行 (采血前一晚禁水禁食)。3.6% 水合氯醛腹腔注射, 动物麻醉后, 从右心房插针取血。采集束缚组中筛选出的应激性高血压大鼠的血样, 正常对照组中随机选出 8 只正常大鼠采集血样。

1.2.4 酶联免疫 Elisa 法检测 TGF- $\beta 1$ 浓度 每只大鼠采集血样 2mL, 3000 r/min 离心 15 min 后提取血清, 放置于 -80℃ 冰箱内保存待测。利用 TGF- $\beta 1$ 试剂盒通过 ELISA 法进行检测, 所有步骤按照试剂盒内说明书的要求操作。用酶标仪测定吸光度 (OD 值), 通过标准曲线计算 TGF- $\beta 1$ 浓度。

1.2.5 RT-qPCR 检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达 应激性高血压大鼠和正常对照组各随机抽取 4 只大鼠, 大鼠处死后, 立即取出心脏, 剪下约 100mg 左心室心肌组织, 加入 1mL 预冷的 Trizol, 提取总 RNA, 将其反转录为 cDNA, 于 -20℃ 冰箱中保存待测。设计引物, 检测 TGF- $\beta 1$ mRNA 的相对表达量。引物设计如下: (1) TGF- $\beta 1$ forward primer: 5'- GC TGAG CG CTTTCTGATCCT -3'; (2) TGF- $\beta 1$ reverse primer: 5'- CGAGTGTGCTGCAGGTAGACA -3'; (3) β -actin forward primer: 5'- CTGGGACGACAT GG AGA A AA-3'; (4) β -actin reverse primer: 5'- AA GGA AGGCTGGAAGAGTGC-3'。反应条件: 95℃、95℃、60℃、72℃、分别 10min、10s、30s、30s, 进行 40 个循环; 融解曲线: 温度 72℃ ~95℃。设 β -actin 为内参, 计算 TGF- $\beta 1$ mRNA 的相对表达量, 实验重复 3 次并取均值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 ($\Delta\Delta Ct =$ 试验样品 $\Delta Ct -$ 基准样品 ΔCt) 计算各组心肌组织中目的基因 mRNA 表达水平; 若 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$, 提示目的基因表达水平升高; 若 $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$, 提示目的基因表达水平降低。

1.2.6 Western blot 检测大鼠心肌组织 TGF- $\beta 1$ 的表达 应

激性高血压大鼠和正常对照组各随机抽取 4 只大鼠, 取大鼠心肌组织约 100mg, 并按照比例加裂解液, 匀浆器匀浆至完全裂解。样品在 4℃ 环境下, 12000r/min 离心 20min, 取上清液定量检测蛋白质, 后置于 -80℃ 冰箱中保存。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉中 4℃ 过夜, 分别加入一抗 TGF-β1 抗体 (1:2000) 和 β-actin 抗体 (1:1500), 4℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入二抗 (1:1500), 于室温下孵育 1h, TBST 洗膜 3 次。与 ECL 反应 1~5min, 曝光、显影、定影。用凝胶图像处理软件定量分析蛋白条带的灰度值, 以 β-actin 蛋白作为参比, 对蛋白条带标准化处理。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/β-actin 条带灰度值。

1.3 统计学处理

利用 SPSS 17.0 进行标准差计算, 实验数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间分析比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性应激性高血压大鼠筛选

与对照组相比, 束缚组大鼠的 SBP 和 DBP 同时升高, 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 1。且有 8 只大鼠 (第 7 天组 2 只、第 14 天组 3 只、第 21 天组 3 只) 出现高血压的症状, 即 SBP ≥ 150 mmHg 为高血压。在慢性束缚应激后, 大鼠应激性高血压的发病率为 26.7%。

表 1 各组动物血压值的比较 ($\bar{x} \pm s$), mmHg

	正常对照组 (n=18)	束缚组 (n=30)
SBP	108.6 ± 6.4	129.3 ± 29.2*
DBP	89.9 ± 6.0	101.4 ± 20.6*

与正常对照组相比, * $P < 0.05$ 。

2.2 血清中 TGF-β1 表达水平对比

束缚应激性高血压大鼠血清中 TGF-β1 水平明显高于正常对照组 [$(56.62 \pm 2.74) \mu\text{g/L}$ vs $(48.54 \pm 3.19) \mu\text{g/L}$], 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 TGF-β1 mRNA 及蛋白表达水平比较

慢性束缚应激性高血压大鼠左心室心肌组织 TGF-β1 mRNA 及其蛋白表达量均高于正常对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组动物左心室心肌组织中 TGF-β1 mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

	正常对照组 (n=4)	应激性高血压组 (n=4)
TGF-β1 mRNA	1.49 ± 0.31	4.77 ± 0.40*
TGF-β1	1.14 ± 0.13	4.25 ± 0.47*

与正常对照组相比, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

应激已成为现代社会一个不争的事实, 快节奏的生活正在潜移默化地改变人们的生活方式。许多人养成了久坐不动的生活方

式, 再加上生活各个方面的压力, 久而久之导致了慢性应激的发生。慢性束缚应激是在长期束缚的条件下给予动物的一种非躯体损伤刺激。慢性束缚应激模型在一定程度上模拟了人类的致病过程, 此次实验动物的肾上腺指数明显增加 (本文未显示), 说明应激束缚模型的建立是成功的, 并且成功筛选出因束缚应激而导致高血压的大鼠。

本次实验在束缚应激大鼠中筛选出 SBP ≥ 150 mm Hg 的高血压大鼠作为研究对象。根据实验数据, 束缚高血压大鼠血清中 TGF-β1 和左心室的 TGF-β1 mRNA 和 TGF-β1 蛋白表达水平都明显高于正常组, 证实由慢性束缚应激导致的高血压疾病中, TGF-β1 的表达也相应地增高, 提示应激性高血压的发生, 与 TGF-β1 的表达增高有关。这与既往的研究报道相符, 原发性高血压患者血清 TGF-β1 水平显著升高, 而过度表达 TGF-β1 的大鼠也表现出血压升高的症状^[3]。因为过多的 TGF-β 表达 (TGF-β 的高表达) 可使血管直径缩小, 外周阻力增加, 从而使血压升高^[4]。在人类高血压病的发生发展及其并发症中, TGF-β1 的过度表达参与血管、心肌肥厚, 心肌纤维化、冠心病、心力衰竭等靶器官的损害和病变过程^[5]。由此看来, TGF-β1 在心血管疾病发生和发展中发挥多种作用。

综上所述, 慢性束缚应激可导致高血压的发生, 并与生长转化因子 TGF-β1 的高表达水平具有密切相关性。但由于本次实验用到的实验动物数量不多, 生长转化因子 TGF-β1 的高表达水平与高血压的关系仍还需要进一步研究。另外, TGF-β1 的表达水平与应激的关系和强度仍不清楚。将来对于 TGF-β1 的研究是国内学者攻克心血管疾病的一个重要研究方向, 研究应激过程中 TGF-β1 的表达水平可能是其中的一个突破口。

参考文献

[1] BAUTISTA L E, BAJWA P K, SHAFER M M, et al. The relationship between chronic stress, hair cortisol and hypertension[J]. International Journal of Cardiology Hypertension, 2019, 2(C): 100012.

[2] 游志辉, 欧阳征仁. 转化生长因子 β 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 中国社区医师, 2019, 35(16): 8, 12.

[3] 梁宇明, 何燕. 自发性高血压大鼠左心室心肌组织骨形成蛋白和激活素的跨膜抑制剂、转化生长因子 β1 表达情况及其与室性心律失常易感性的关系研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28(5): 61-65, 71.

[4] CHEN Y, WANG. Is Transforming growth factor β1 a cause of hypertension? [J]. American journal of hypertension, 2017, 30(8): 767-769.

[5] 王正辉, 张国辉. 转化生长因子 β1 与心血管疾病的研究进展 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(2): 405-409.

(上接第 41 页)

[4] 朱千凯, 杨国存, 孙忠亮, 等. 手法复位联合耳穴压豆治疗良性阵发性位置性眩晕效果观察 [J]. 中国乡村医药, 2021, 28(12): 40-41.

[5] 丁国胜, 董科. 耳石手法复位治疗良性阵发性位置性眩晕的临床观察 [J]. 基层医学论坛, 2021, 25(17): 2505-2506.

[6] 罗孟丽. 手法复位治疗老年良性阵发性位置性眩晕患者的效果及安全性 [J]. 听力学及言语疾病杂志, 2021, 29(5): 565-567.

[7] 李云, 崔丽萍, 董文荣, 等. 甲磺酸倍他司汀片联合手

法复位治疗良性阵发性位置性眩晕的疗效 [J]. 河北医药, 2021, 43(9): 1350-1353.

[8] 王建忠. 倍他司汀联合手法复位治疗良性阵发性位置性眩晕患者的临床效果分析 [J]. 临床医学工程, 2021, 28(4): 501-502.

[9] 邱锦华, 陈青, 黄晓聪. 手法复位联合平衡板训练治疗良性阵发性位置性眩晕的疗效观察 [J]. 当代医学, 2021, 27(10): 105-107.