Tianjin Med J, February 2023, Vol. 51 No. 2

实验研究

VEGFR-3⁺单核细胞对高血压小鼠左心室重塑的影响

杨国红[1]，余芳芳[1]，蔡伟[1]，牛秀珑[1]，张芯[1]，赵季红[1]，李玉明[2]，陈少伯[1△]

摘要：目的 探讨高血压小鼠外周血血管内皮生长因子受体（VEGFR）-3⁺单核细胞对高盐诱导的高血压性左心室重塑的影响。**方法** 将6周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为正常盐饮食组（0.5% NaCl，NS组）、高盐饮食组（8% NaCl，HS组）、HS+N-硝基-L-精氨酸甲酯（L-NAME）组（HS+L组）以及HS+L-NAME+外周血VEGFR-3⁺单核细胞（PBMV）干预组（HS+L+PBMV组），在饮食干预第9~12周对高血压小鼠进行PBMV干预。所有小鼠以标准的尾压法测定无创尾压；利用Vevo 2100超声影像系统测定心脏结构和功能；荧光定量PCR检测小鼠心肌组织张力应答增强子结合蛋白（TonEBP）及淋巴管内皮细胞标志物mRNA表达水平；以Masson染色观察心肌组织纤维化程度；以麦芽胚凝集素（WGA）荧光染色计算心肌细胞横截面积（CSA）。**结果** 干预结束时，HS+L组收缩压显著高于其他3组（$P<0.05$）；HS+L+PBMV组TonEBP的mRNA水平低于HS+L组，与淋巴内皮细胞相关的标志物VEGF-C、Prox-1、Podoplanin、LYVE-1的mRNA表达水平显著高于HS+L组（$P<0.05$）；心脏超声结果显示，HS+L+PBMV组左心室舒张末期内径（LVEDD）及左心室后壁厚度（LVPWT）显著低于HS+L组，左心室射血分数（LVEF）及左心室缩短分数（LVFS）显著高于HS+L组（$P<0.05$）；病理学结果显示，HS+L+PBMV组CVF及CSA明显低于HS+L组（均$P<0.05$）。**结论** PBMV能在降低高血压小鼠收缩压水平的同时，减轻左心室重塑，其机制可能与PBMV促进淋巴管增生有关。

关键词：高血压；心室重构；血管内皮生长因子受体3；单核细胞；淋巴管生成；流式细胞术；高盐

中图分类号：R544.11　　**文献标志码：**A　　**DOI：**10.11958/20221051

Effects of peripheral blood VEGFR-3⁺ monocytes on left ventricular remodeling in mice with hypertension

YANG Guohong[1], YU Fangfang[1], CAI Wei[1], NIU Xiulong[1], ZHANG Xin[1], ZHAO Jihong[1], LI Yuming[2], CHEN Shaobo[1△]

1 Institute of Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases in Alpine Environment of Plateau, Tianjin Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Target Organ Injury, Characteristic Medical Center of the Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2 TEDA International Cardiovascular Hospital

△Corresponding Author　E-mail: chensbwj@126.com

Abstract: Objective To explore the effects of peripheral blood VEGFR-3⁺ monocytes (PBMV) on left ventricular (LV) remodeling induced by high salt intake. **Methods** Six-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into the 0.5% NaCl concentration diet (W/W, normal salt, NS) group, the 8% NaCl concentration diet (W/W, high salt, HS) group, the HS+N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, HS+L) group and the HS+L+PBMV treatment group. PBMV intervention was performed in hypertensive mice from 9-12 weeks after high salt diet intervention. Noninvasive tail pressure was measured by standard tail pressure method in all mice. Cardiac structure and function were determined using a Vevo 2100 ultrasound imaging system. The mRNA levels of tonicity responsive enhancer binding protein (TonEBP) and lymphatic endothelial cell markers in mouse myocardial tissue were detected by fluorescence quantitative PCR. Masson staining was used to observe the degree of myocardial fibrosis. Calculation of cardiomyocyte cross-sectional area (CSA) was analyzed by fluorescence staining of malt germ lectin (WGA). **Results** At the end of the intervention, the systolic pressure (SBP) was significantly increased in the HS+L group compared with the other groups ($P<0.05$). The mRNA levels of TonEBP was significantly lower while the lymphatic endothelial cell markers of VEGF-C, Prox-1, Podoplanin and LYVE-1 were significanly higher in the HS+L+PBMV group than those of the HS+L group ($P<0.05$). Echocardiography measurement demonstrated that the LV end-diastolic dimension (LVEDD) and LV posterior wall thickness (LVPWT) were significantly decreased in the HS+L+PBMV group than those of the HS+L group. The LV ejection fraction (LVEF) and LV fractional shortening (LVFS) were significantly increased in the HS+L+PBMV group compared with those of the HS+L group ($P<0.05$). The pathological results showed that

基金项目：国家自然科学金资助项目（81600328）；天津市自然科学基金资助项目（16JCQNJC11800）；天津市科技重大专项资助项目（15ZXJZSY00010）

作者单位：1中国人民武装警察部队特色医学中心，高原高寒环境及心血管病防治研究所，天津市心血管重塑与靶器官损伤重点实验室（邮编300162）；2泰达国际心血管病医院

作者简介：杨国红（1981），男，副主任医师，主要从事高血压及冠心病的基础与临床方面研究。E-mail：hong-20020@163.com

△通信作者　E-mail：chensbwj@126.com

the CVF and CSA were significantly decreased in the HS+L+PBMV group than those of the HS+L group ($P<0.05$). **Conclusion** The present study demonstrates that PBMV treatment can reduce SBP and ameliorate LV remodeling in hypertensive mice, which may be related to promoting lymphangiogenesis.

Key words: hypertension; ventricular remodeling; vascular endothelial growth factor receptor-3; monocytes; lymphangiogenesis; flow cytometry; high salt

随着人们生活水平的提高及生活方式的变化，高血压的患病率持续增高。2012—2015 年中国高血压调查发现，我国成人高血压患病人数为 2.45 亿，患病率高达 27.9%，由此造成的心血管疾病的负担也与日俱增[1]。防治高血压及相关的靶器官损伤，进而控制心血管疾病的发展，已刻不容缓。笔者前期研究发现，自发性高血压大鼠（SHR）在质量分数为 8% 的 NaCl 饮食下干预 12 周可引起收缩压的显著增高和心肌淋巴管的增生，而通过过表达血管内皮生长因子（VEGF）-C 促使淋巴管过度增生，可使收缩压及左心室重塑得到改善[2-3]。另有报道，外周血中有一部分组成性表达血管内皮生长因子受体（VEGFR）-3 的幼稚单核细胞，在特定的条件下可进入外周组织分化为淋巴管内皮细胞，促进淋巴管的生成[4-6]。可否通过调节 VEGFR-3$^+$单核细胞来改善高血压及左心室重塑，目前尚少见相关报道。本研究利用流式细胞仪分选 VEGFR-3$^+$单核细胞，对高血压小鼠进行干预，观察 VEGFR-3$^+$单核细胞对高盐诱导的高血压及左心室重塑的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 100 只［动物生产许可证号：SCXK（京）2014-0013］及不同质量分数 NaCl 饲料均购自天津市奥臣实验动物销售有限公司；山羊抗小鼠 VEGFR-3-Flt-4 抗体购自 R&D Systems 公司；大鼠抗小鼠 Ly6G-PerCP/Cy5.5、大鼠抗小鼠 CD11b-PE 抗体、大鼠抗小鼠 F4/80-PE-Cy5 抗体均购自 Biolegend 公司；TRIzol 购自 TAKARA 公司；Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR Green 实时定量 PCR 试剂购自 Roche 公司，所用引物购自北京六合华大基因科技有限公司；N-硝基-L-精氨酸甲酯（Nω-Nitro-L-arginine Methyl Ester，L-NAME）、麦胚凝集素（wheat germ agglutinin，WGA）均购自 Sigma 公司；4'，6-diamidino-2-phenylindole，dihydrochloride（DAPI）购自 Roche 公司；Masson 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；小鼠尾压 CODA™ 监测系统购自美国 Kent Scientific 公司；荧光定量 PCR（qPCR）仪（ABI 7300）购自美国 Applied Biosystems 公司；FC 500 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司；FACSAria 流式细胞分选系统购自美国 BD 公司；Vevo 2100 超声影像系统购自加拿大 Visual Sonic 公司；E600POL 偏振光显微镜和 ECLIPSE 80i 荧光显微镜均购自日本 Nikon 公司。

1.2 方法

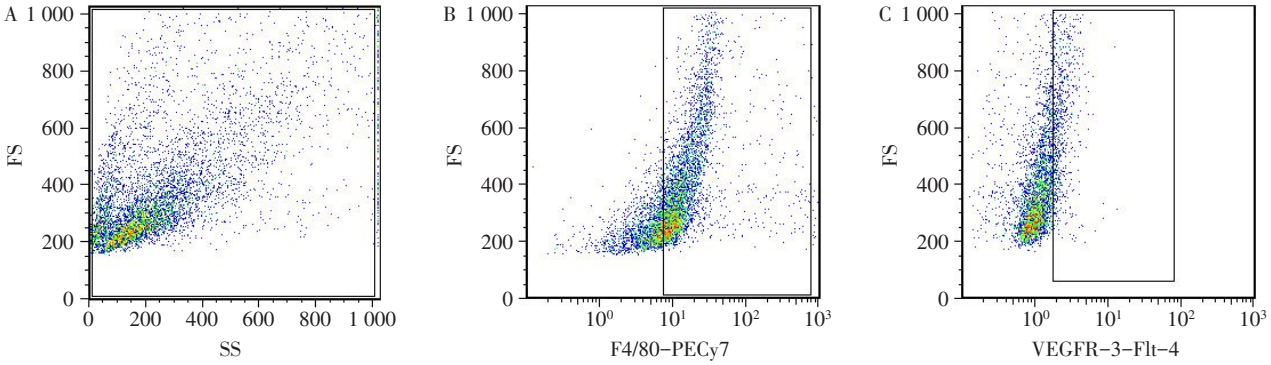
1.2.1 实验动物分组与喂养方法 C57BL/6 小鼠经适应性喂养 1 周后，以随机数字表法分为正常盐（0.5%NaCl）饮食组（NS 组，n=10）、高盐（8%NaCl）饮食组（HS 组，n=10），HS+L-NAME 组（HS+L 组，n=50）及 HS+L-NAME+外周血 VEGFR-3$^+$单核细胞（PBVM）干预组（HS+L+PBVM 组，n=30）。所有实验小鼠均饲养于清洁级实验室，饲养条件：室温 20~24 ℃，相对湿度 55%~65%，氨浓度 < 20 mg/L，自由饮水，给光 7：00—19：00。分别在干预前、8 周、12 周利用小鼠尾压监测系统动态测量小鼠收缩压。

1.2.2 PBVM 的制备与干预 在高盐饮食干预 9~12 周时利用 FACSAria 流式细胞分选系统采集 HS+L 组小鼠 PBVM，具体方法如下：经下颌下静脉采集 C57BL/6 小鼠外周血 1 mL 加入 EDTA 抗凝的 EP 管中混匀。依次加入抗小鼠 Ly6G-PerCP-Cy5.5、CD11b-PE 及 VEGFR-3-Flt-4 抗体与抗凝血混匀并避光孵育 15 min，之后加入 10 mL 红细胞裂解液避光孵育 10 min，350×g 离心 5 min 弃上清液后加入 1 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞，再次以 350×g 离心 5 min，随后以 1.5 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞，上机分选。分选所得 PBVM 经尾静脉注射对 HS+L+PBVM 组小鼠进行干预，从高盐饮食干预第 9 周开始，每周干预 1 次，每次 5×10^5 个 PBVM，共 4 次。

1.2.3 小鼠心肌组织 PBVM 的鉴定 于 PBVM 注射后第 1 周的第 1、2、3、5、7 天分别处死部分 HS+L+PBVM 及 HS+L 组小鼠（每组每次 4 只）取心肌组织制备单个核细胞悬液，利用流式细胞术对单个核细胞悬液中 VEGFR-3$^+$巨噬细胞进行鉴定。小鼠心肌剪碎后，冷 PBS 清洗 3 次，将含组织块的 PBS 悬液置于 Medmachine（Dako，Denmark）中制备单个核细胞。随后用 300 目滤器过滤，250×g 离心 5 min，沉淀物以 PBS 重悬。制备的单个核细胞中依次加入抗小鼠 F4/80-PE-Cy5 及 VEGFR-3-Flt-4 抗体，混匀并避光孵育 15 min，弃上清后加入 500 μL 细胞染色缓冲液重悬细胞，上机检测，设门方法见图 1。应用 Flow Jo 7.6.1 软件对流式数据进行分析[7]。

1.2.4 qPCR 12 周高盐饮食干预结束后处死各组小鼠，取左心室心肌组织，以 TRIzol 法提取细胞总 RNA，逆转录合成 cDNA 后，以 qPCR 检测心肌组织张力应答增强子结合蛋白（TonEBP）以及淋巴管内皮细胞标志物同源盒转录因子（Prox）-1、淋巴管透明质酸受体（LYVE）-1、足蛋白（Podoplanin）、VEGF-C mRNA 表达水平。PCR 反应体系 20 μL：cDNA 模板 1 μL，上、下游引物各 0.5 μL，2×SYBR Green Master 10 μL，MilliQ 超纯水 8 μL。PCR 反应条件：50 ℃ 2 min；95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，30 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达水平：ΔΔCt= 实验组（$Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因}$）-对照组（$Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因}$）。所用引物序列见表 1。

1.2.5 小鼠心脏超声参数测定 在高盐干预 12 周末进行小鼠心脏超声参数的测定。在麻醉状态（2.5% 异氟烷）下进行



A：门内为单个核细胞，占90.4%；B：门内为F4/80$^+$巨噬细胞，占69.7%；C：门内为F4/80$^+$/VEGFR-3$^+$巨噬细胞，占18.9%。

Fig. 1　The gating method for flow cytometry analysis of F4/80$^+$/VEGFR-3$^+$ macrophages

图1　F4/80$^+$/VEGFR-3$^+$巨噬细胞流式细胞术分析的设门方法

Tab. 1　The primer sequence of qPCR

表1　qPCR引物序列

基因名称	引物序列(5′→3′)	产物大小(bp)
β-actin	上游：CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	104
	下游：ACCAGAGGCATACAGGGACA	
Prox-1	上游：ATACCGAGCCCTCAACATGC	87
	下游：CGTAACGTGATCTGCGCAAC	
LYVE-1	上游：GGCTTTGAGACTTGCAGCTATG	177
	下游：GCAGGAGTTAACCCAGGTGT	
Podoplanin	上游：TGGCAAGGCACCTCTGGTA	77
	下游：TGAGGTGGACAGTTCCTCTAAGG	
VEGF-C	上游：GTTACAGAAGACCGTGTGCGAATC	85
	下游：GATGGGACACAGCGGCATA	
TonEBP	上游：TTCATAGTTGGAATTTCAGAGCA	153
	下游：TTGCGAGTATACAAATGTTCCAA	

超声数据的采集，测定的参数包括：左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室舒张末期容积(LVEDV)、左心室收缩末期容积(LVESV)和左心室后壁厚度(LVPWT)，计算左心室缩短分数(LVFS)和左心室射血分数(LVEF)，LVFS=(LVEDD-LVESD)/LVEDD，LVEF=(LVEDV-LVESV)/LVEDV[7]。

1.2.6　小鼠心肌组织病理学分析　取小鼠左心室横截面心肌组织，经石蜡包埋后，制备5 μm厚的切片进行病理染色分析。Masson染色后的切片在显微镜下获取图像，利用Image Pro Plus 5.0软件计算胶原容积分数(CVF)；WGA染色后的切片在荧光显微镜下获取图像，利用Image Pro Plus 5.0分析软件计算心肌细胞横截面积(CSA)，每张切片选取10个视野，所得平均值进行统计分析。

1.3　统计学方法　应用SPSS 18.0软件进行数据分析，连续型变量以$\bar{x}\pm s$表示，2组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用LSD-t检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组小鼠收缩压比较　高盐干预12周时，HS组、HS+L组及HS+L+PBVM组收缩压水平高于NS组，而HS+L+PBVM组收缩压水平较HS+L组显著减低，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表2。

Tab. 2　The comparison of systolic blood pressure of mice between different groups

表2　各组小鼠收缩压的比较(n=8，mmHg，$\bar{x}\pm s$)

组别	基线	8周	12周
NS组	113.13±4.82	115.13±5.69	113.25±4.33
HS组	114.25±4.17	134.63±4.57^a	136.63±13.05^a
HS+L组	112.25±4.23	137.13±6.24^a	152.88±19.36^{ab}
HS+L+PBVM组	113.63±3.11	138.00±13.71^a	138.50±7.07^{ac}
F	0.335	13.380**	12.850**

**$P<0.01$；^{a}与NS组比较，^{b}与HS组比较，^{c}与HS+L组比较，$P<0.05$。1 mmHg=0.133 kPa。

2.2　小鼠心肌组织中F4/80$^+$/VEGFR-3$^+$巨噬细胞的分析结果　小鼠心肌组织中VEGFR-3$^+$巨噬细胞流式细胞术分析结果显示，注射PBVM后，HS+L+PBVM组的F4/80$^+$/VEGFR-3$^+$巨噬细胞比例显著高于HS+L组；HS+L+PBVM组F4/80$^+$VEGFR-3$^+$细胞在第3天达峰值，随后逐渐减低，见表3。

2.3　各组小鼠淋巴管内皮细胞相关标志物及TonEBP的mRNA表达水平的比较　HS组、HS+L组及HS+L+PBVM组TonEBP、VEGF-C、Prox-1、Podoplanin及LYVE-1的mRNA表达水平高于NS组，差异均有统计学意义($P<0.05$)；同时，HS+L+PBVM组VEGF-C、Prox-1、Podoplanin及LYVE-1的mRNA表达水平高于HS+L组，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见表4。

2.4　各组小鼠心脏超声结果比较　与NS组比较，HS组、HS+L组及HS+L+PBVM组LVEDD显著增加，LVEF及LVFS显著减低，差异均有统计学意义($P<0.05$)，出现不同程度的左心室肥厚及心脏收缩功能减低。HS+L+PBVM组LVEDD、LVPWT低于HS+L组，LVFS、LVEF高于HS+L组，差异均有统计学意义($P<0.05$)，见图2、表5。

Tab. 3 The comparison of the ratio of F4/80$^+$/VEGFR−3$^+$ macrophages in myocardial tissue of mice between the two groups

表3 2组小鼠心肌组织中F4/80$^+$/VEGFR−3$^+$巨噬细胞比例的比较 （n=4，%，$\bar{x}\pm s$）

组别	第1天	第2天	第3天	第5天	第7天
HS+L组	14.62±0.28	14.92±0.39	14.96±0.31	15.07±0.23	14.89±0.86
HS+L+PBVM组	17.58±1.96	24.67±0.74	27.83±0.98	24.76±3.46	17.26±1.35
t	2.990*	23.310**	25.040**	5.589**	2.961*

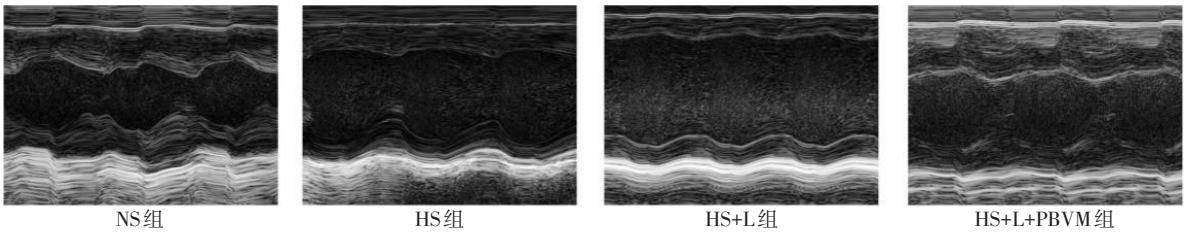
*P < 0.05，**P < 0.01。

Tab. 4 The comparison of mRNA expression levels of phenotype markers of lymphatic endothelial cells and TonEBP between the four groups of mice

表4 各组小鼠淋巴管内皮细胞表型标志物及TonEBP的mRNA表达水平比较 （n=3，$\bar{x}\pm s$）

组别	TonEBP	VEGF−C	Prox−1	Podoplanin	LYVE−1
NS组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
HS组	2.17±0.27[a]	1.88±0.41[a]	2.77±0.48[a]	2.33±0.64[a]	2.69±0.49[a]
HS+L组	2.87±0.82[a]	1.80±0.40[a]	2.56±0.45[a]	2.41±0.49[a]	2.88±0.55[a]
HS+L+PBVM组	2.35±0.72[a]	3.16±0.55[abc]	3.73±0.34[abc]	3.95±0.46[abc]	4.38±1.03[abc]
F	5.906*	15.260**	28.360**	20.400**	14.330**

*P < 0.05，**P < 0.01；[a]与NS组比较，[b]与HS组比较，[c]与HS+L组比较，P < 0.05。



NS组　HS组　HS+L组　HS+L+PBVM组

Fig. 2 The representative images of M−mode ultrasound of mice in each group

图2 各组小鼠心脏M型超声代表性图片

Tab. 5 The comparison results of ultrasound indexes of mice between each group

表5 各组小鼠心脏超声指标的比较结果（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	LVEDD（mm）	LVEF	LVFS	LVPWT（mm）
NS组	2.68±0.45	0.65±0.03	0.33±0.03	0.76±0.11
HS组	3.50±0.52[a]	0.48±0.04[a]	0.24±0.05[a]	0.88±0.06[a]
HS+L组	4.03±0.15[ab]	0.41±0.07[ab]	0.19±0.02[ab]	0.98±0.11[a]
HS+L+PBVM组	3.25±0.06[ac]	0.56±0.05[abc]	0.27±0.03[ac]	0.75±0.08[c]
F	12.540**	21.740**	17.120**	6.460**

**P < 0.01；[a]与NS组比较，[b]与HS组比较，[c]与HS+L组比较，P < 0.05。

2.5 各组小鼠左心室心肌组织病理结果比较　与NS组比较，HS组、HS+L组及HS+L+PBVM组CSA及CVF显著增加，差异均有统计学意义（P < 0.05），左心室心肌细胞均有不同程度肥大，心肌间质纤维化程度增加。HS+L+PBVM组心肌CSA及CVF低于HS+L组，差异均有统计学意义（P < 0.05），见图3、表6。

3 讨论

高血压是心血管疾病最重要的危险因素之一[8]。随着对高血压发病机制研究的不断深入，高盐饮食与高血压的关系成为研究的热点[7,9-10]。长期高盐饮食不仅可以引起血压的升高，还可独立于血压水平引起靶器官的损伤[11-12]。由于人们高盐饮食习惯在短时间内难以改变，探索高盐摄入引起高血压及靶器官损伤的机制，以延缓高血压及靶器官的损伤进程尤为重要。

成年个体新生淋巴管的生成机制目前尚不清楚。有研究报道，外周血中有一部分组成性表达VEGFR−3的幼稚单核细胞，在特定条件下可以向2个方向分化，其中一部分在肿瘤坏死因子−α和（或）其他炎性因子的刺激下转化为能分泌VEGF−C的巨噬细胞，诱导淋巴管内皮细胞的增殖；另一部分可以分化整合到临近的淋巴管成为新的淋巴管内皮细胞[4-6]。笔者前期研究发现，长期的高盐饮食干预在引起SHR大鼠血压显著升高的同时，心肌巨噬细胞浸润程度及淋巴管的密度明显增加，并伴随着心肌细胞的肥大及心肌间质的纤维化，而通过调节巨噬细胞内TonEBP/VEGF−C信号通路引起心肌淋巴管的增生，可使巨噬细胞浸润程度减轻，并明显改善左心室重塑[2-3]。本研究发现，增加VEGFR−3$^+$单核细胞比例可以改善高血压小鼠收缩压及左心室重塑，与此同时，心肌组织中淋巴管内皮细胞标志物表达水平也显著增高，提示VEGFR−3$^+$单核细胞可能通过促进淋巴管的生成进而对血压及左心室重塑产生影响。

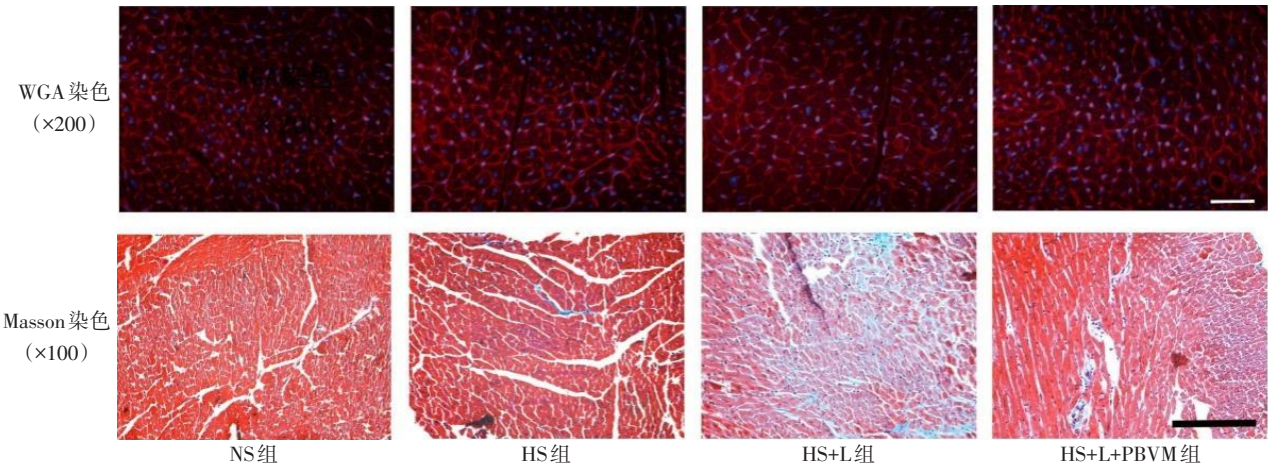


Fig. 3　The representative images of WGA staining of left ventricular muscle of mice in each group

图3　各组小鼠左心室肌WGA及Masson染色的代表性图片

Tab. 6　The pathological staining analysis results of mice in each group

表6　各组小鼠左室心肌CSA及CVF比较结果

（n=4，$\bar{x}\pm s$）

组别	CSA（μm²）	CVF（%）
NS组	368.00±41.24	2.23±0.31
HS组	436.50±30.26[a]	7.33±1.04[a]
HS+L组	592.00±24.12[ab]	16.15±2.07[ab]
HS+L+PBVM组	498.00±36.89[abc]	10.83±1.27[abc]
F	31.750**	77.560**

**P<0.01；[a]与NS组比较，[b]与HS组比较，[c]与HS+L组比较，P<0.05。

关于促进淋巴管的增生可以改善高血压及左心室重塑的机制，主要考虑以下2个方面：（1）高血压状态下心脏淋巴回流受阻，组织液进入淋巴管以及淋巴液回流到静脉的过程均被抑制，引起心肌组织的淋巴水肿，淋巴水肿造成心肌间质压力的增高，而心肌组织水肿液中的蛋白成分也会刺激胶原纤维的合成和沉积，进而导致心肌组织纤维化的加重[13-14]。（2）长期高血压导致的心脏淋巴管的阻塞会引起心室肌细胞水肿、心肌纤维的变性、Z带及闰盘的破裂以及线粒体结构的紊乱等结构的改变，这些改变是心室重塑的重要原因[15]。长期的淋巴管阻塞造成的心肌间质水肿可能由于氧供应受限及诱导缺血而引起心功能的异常，最终引起心力衰竭[16]。本研究显示，通过促进淋巴管的生成，使得心肌间质压力及水肿程度减轻，可以改善心肌纤维化程度及心脏功能。

本研究也存在不足之处。首先，本研究利用FACSAria流式细胞分选系统分选VEGFR-3⁺单核细胞，分选过程可能会对细胞产生一定损伤，研究中也发现分选出来的细胞在培养过程中会有部分死亡，如采用磁珠分选可能会减少细胞损伤，提高实验效率；其次，本研究干预策略是将VEGFR-3⁺单核细胞回输给高血压小鼠，为了减少对细胞的损伤，利用流式细胞术分析间接证实了VEGFR-3⁺单核细胞可进入心肌组织，而采用细胞示踪技术能更直观地观察回输VEGFR-3⁺单核细胞在体内的活动轨迹；再者，本研究观察了VEGFR-3⁺单核细胞对高血压小鼠血压及左心室重塑的影响，但并未对其机制进行深入探讨，需要进一步研究证实。

总之，本研究以高盐诱导的高血压小鼠为研究对象，观察了VEGFR-3⁺单核细胞对高血压性左心室重塑的影响，结果提示通过调节VEGFR-3⁺单核细胞可以改善高血压小鼠收缩压与左心室重塑，为今后高血压及靶器官损伤的防治研究提供了参考。

参考文献

[1] WANG Z, CHEN Z, ZHANG L, et al. Status of hypertension in China: Results from the China Hypertension Survey, 2012-2015 [J]. Circulation, 2018, 137 (22): 2344-2356. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032380.

[2] YANG G H, ZHOU X, JI W J, et al. VEGF-C-mediated cardiac lymphangiogenesis in high salt intake accelerated progression of left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. Clin Exp Hypertens, 2017, 39(8): 740-747. doi: 10.1080/10641963.2017.1324478.

[3] YANG G H, ZHOU X, JI W J, et al. Overexpression of VEGF-C attenuates chronic high salt intake-induced left ventricular maladaptive remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 306 (4): H598-609. doi: 10.1152/ajpheart.00585.2013.

[4] SU C, JIA S, MA Z, et al. HMGB1 Promotes lymphangiogenesis through the activation of RAGE on M2 macrophages in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 4487435. doi: 10.1155/2022/4487435.

[5] WANG C, YUE Y, HUANG S, et al. M2b macrophages stimulate lymphangiogenesis to reduce myocardial fibrosis after myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. Pharm Biol, 2022, 60 (1): 384-393. doi: 10.1080/13880209.2022.2033798.

[6] BOWLIN A, ROYS H, WANJALA H, et al. Hypoxia-inducible factor signaling in macrophages promotes lymphangiogenesis in

实验研究

电针调控Nrf2/HO-1通路对缺血缺氧性脑损伤大鼠小胶质细胞活化的影响

张赟,李珂,补王珍

摘要:目的 探究电针调控核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶1(HO-1)通路对缺血缺氧性脑损伤(HIBD)大鼠小胶质细胞活化的影响。**方法** 随机将40只SD大鼠均分为假手术组、模型组、电针组、电针+全反式维甲酸组。除假手术组外其余组均通过颈总动脉结扎及缺氧建立HIBD大鼠模型,假手术组大鼠仅暴露左侧颈总动脉及迷走神经,不进行结扎及缺氧处理 。造模结束后,电针组于百会穴进行电针刺激;电针+全反式维甲酸组大鼠经电针刺激后腹腔注射全反式维甲酸(7 mg/kg)。通过Longa评分进行大鼠神经行为学评分;旷场及水迷宫实验检测大鼠自主活动能力和认知功能;TUNEL法检测大鼠神经细胞凋亡情况;免疫组化法检测大鼠脑组织中小胶质细胞标志蛋白离子钙结合衔接分子1(Iba1)表达;试剂盒检测大鼠脑组织中白细胞介素10(IL-10)、IL-1β、活性氧(ROS)及丙二醛(MDA)水平;Western blot检测脑组织CD68、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶(Arginase)及Nrf2/HO-1通路相关蛋白表达。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠神经行为学评分、逃避潜伏期、大脑皮质神经细胞凋亡率、Iba1、IL-1β、MDA水平、ROS荧光强度、CD68、iNOS表达增加,运动路程、站立次数、穿越平台次数、IL-10、Arginase、Nrf2及HO-1水平降低($P<0.05$);电针可降低HIBD大鼠神经行为学评分、逃避潜伏期、神经细胞凋亡率、Iba1、IL-1β、MDA水平、ROS荧光强度、CD68、iNOS表达,增加运动路程、站立次数、穿越平台次数、IL-10、Arginase、Nrf2及HO-1水平($P<0.05$);电针+全反式维甲酸组可逆转电针对上述指标的影响。**结论** 电针可能通过激活Nrf2/HO-1通路抑制HIBD大鼠小胶质细胞过度活化,并促进其由M1型向M2型转变。

关键词:缺氧缺血,脑;动物,新生;电针;核因子NF-E2相关因子;血红素加氧酶1;小胶质细胞

中图分类号:R285.5　　**文献标志码:**A　　**DOI:**10.11958/20220792

基金项目:青海省科技计划项目(2019-ZJ-T06)

作者单位:青海省妇女儿童医院新生儿科(邮编810007)

作者简介:张赟(1982),女,主治医师,主要从事新生儿早产儿方面研究。E-mail:ztwxme@163.com

leishmania major infection [J]. Infect Immun, 2021, 89(8): e0012421. doi:10.1128/IAI.00124-21.

[7] YU F F, YANG G H, CHEN S B, et al. Pseudolaric acid b attenuates high salt intake-induced hypertensive left ventricular remodeling by modulating monocyte/macrophage phenotypes [J]. Med Sci Monit, 2021, 27: e932404. doi:10.12659/MSM.932404.

[8] BENJAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A, et al. Heart disease and stroke Statistics-2019 Update: A report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2019, 139(10): e56-e528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659.

[9] CAI W, LANG M, JIANG X, et al. Correlation among high salt intake, blood pressure variability, and target organ damage in patients with essential hypertension: Study protocol clinical trial (SPIRIT compliant)[J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(14): e19548. doi:10.1097/MD.0000000000019548.

[10] FURUSHO T, SOHARA E, MANDAI S, et al. Renal TNFα activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2020, 97(4): 713-727. doi:10.1016/j.kint.2019.11.021.

[11] MITSIDES N, ALSEHLI F, MC HOUGH D, et al. Salt and water retention is associated with microinflammation and endothelial injury in chronic kidney disease[J]. Nephron, 2019, 143(4): 234-242. doi:10.1159/000502011.

[12] OHASHI N, ISHIGAKI S, ISOBE S, et al. Salt loading aggravates the relationship between melatonin and proteinuria in patients with chronic kidney disease[J]. Intern Med, 2019, 58(11): 1557-1564. doi:10.2169/internalmedicine.1929-18.

[13] ZOSHIMA T, OKADA H, KAWANO M. Systemic sarcoidosis with subcutaneous, muscular, cardiac, and lymph node involvement[J]. Clin Rheumatol, 2022, 41(9): 2913-2914. doi: 10.1007/s10067-022-06222-y.

[14] OE Y, ISHIBASHI-UEDA H, MATSUYAMA T A, et al. Lymph vessel proliferation on cardiac biopsy may help in the diagnosis of cardiac sarcoidosis[J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(2): e010967. doi:10.1161/JAHA.118.010967.

[15] BAI J, YIN L, YU W J, et al. Angiotensin II induces cardiac edema and hypertrophic remodeling through lymphatic-dependent mechanisms[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5044046. doi: 10.1155/2022/5044046.

[16] NIELSEN N R, RANGARAJAN K V, MAO L, et al. A murine model of increased coronary sinus pressure induces myocardial edema with cardiac lymphatic dilation and fibrosis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 318(4): H895-H907. doi: 10.1152/ajpheart.00436.2019.

(2022-07-04收稿　2022-08-19修回)

(本文编辑　李国琪)