

• 基础论著 •

高脂饮食对大鼠脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 及 Claudin-5 表达的影响

李芸 柳弥 吴碧华 王冠 任琳

【摘要】 目的 研究高脂饮食对大鼠脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 及 Claudin-5 表达的影响, 初步探讨高脂毒性对大鼠脑微血管的损伤机制。方法 (1) 40 只 SD 大鼠随机分为高脂组与正常对照组, 每组 20 只, 分别予以高脂饲料和普通饲料喂养 8 周。(2) 测定各组大鼠基础、第 4 周、第 8 周时体重及代谢指标变化。(3) 8 周时处死各组大鼠, 免疫组化检测各组大鼠脑微血管内皮细胞上 HIF-1 α 及 Claudin-5 蛋白表达情况, 伊文氏蓝 (EB) 染色检测血-脑屏障 (BBB) 的通透性。结果 (1) 高脂组大鼠体重由基础值 (165.00 \pm 12.100) g 增加至 8 周时的 (401.30 \pm 66.827) g; 对照组大鼠体重由基础值 (163.00 \pm 10.100) g 增加至 8 周时的 (321.10 \pm 18.300) g, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。(2) 高脂组大鼠空腹血总胆固醇 (TC) 由基础值 (1.576 \pm 0.138 9) mmol/L 升高为 8 周时的 (2.032 \pm 0.365 0) mmol/L, 甘油三酯 (TG) 由基础值 (0.601 \pm 0.117 2) mmol/L 升高至 8 周时的 (2.679 \pm 1.087 6) mmol/L, 且显著高于相应时间点正常对照组 ($P<0.05$)。(3) 8 周时高脂组大鼠脑皮质微血管内皮细胞上, HIF-1 α 表达强于正常对照组 ($P<0.05$), Claudin-5 表达呈弱阳性, 正常对照组大鼠 Claudin-5 呈强阳性表达 ($P<0.05$)。(4) 8 周时高脂组大鼠 EB 含量较正常对照组升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 高脂可通过上调 HIF-1 α 蛋白的表达水平使紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达下降, 导致微血管病变及增加 BBB 的通透性。

【关键词】 高脂血症; 缺氧诱导因子 1, α 亚基; Claudin-5

Effect of high fat diet on claudin-5 expression in rat brain microvascular endothelial cells Li Yun*, Liu Mi, Wu Bihua, Wang Guan, Ren Lin. *Health Management Center, North Sichuan Medical College Affiliated Hospital, Nanchong 637000, China

Corresponding author: Wu Bihua, Email: bhua100@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of high-fat diet on HIF-1 α and Claudin-5 expression in rat brain microvascular endothelial cells, preliminary study injury mechanism of fat toxicity on rat brain microvascular. **Methods** (1) 40 SD rats were randomly divided into high-fat group ($n=20$) and normal food groups ($n=20$), respectively to be fed with high fat diet and regular food eight weeks. (2) The weight, TG and TC of rats in each group were detected in baseline, 4 weeks and 8 weeks. (3) The rats were killed after 8 weeks, the protein level of HIF-1 α , and Claudin-5 in the brain microvascular endothelial cells were determined by immunohistochemistry staining. Evans blue staining detect blood-brain barrier permeability. **Results** (1) High-fat groups' weight increased from (165.00 \pm 12.100)g to (401.30 \pm 66.827)g, control groups' weight increased from (163.00 \pm 10.100)g to (321.10 \pm 18.300)g, the difference was statistically significant ($P<0.05$) on 8 weeks; (2) High-fat groups' fasting TC by the underlying value of (1.576 \pm 0.138 9)mmol/L increased to 8 weeks of (2.032 \pm 0.365 0)mmol/L, TG by the underlying value of (0.601 \pm 0.117 2)mmol/L increased to (2.679 \pm 1.087 6)mmol/L at 8 weeks, and significantly higher than the corresponding time points normal control group ($P<0.05$). (3) High-fat group rat brain cortex microvascular endothelial cells, HIF-1 α expression was stronger than the normal control group after 8 weeks ($P<0.05$), Claudin-5

expression was weakly positive, normal control rats Claudin-5 expression was strongly positive ($P < 0.05$). (4) EB content of high-fat group increased compared with normal control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$) after 8 weeks. **Conclusion** Hyperlipidemia can increase HIF-1 α protein levels and lead to tight junction protein Claudin-5 expression decreased, resulting in microvascular disease and increasing BBB permeability.

【Key words】 Hyperlipidemia; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Claudin-5

随着社会经济的快速发展,人民生活水平的不断提高,人们健康意识的滞后,进食高脂肪食物的机会较多,工作压力大、运动时间少,导致高脂血症人群逐年增长,随之而来的脑血管疾病的发病率不断升高。高脂血症是脑卒中的危险因素,脑血管功能障碍与高脂饮食持续时间有直接的关系^[1]。高脂血症抑制血管内皮生长因子诱导的血管生成,影响脑血流量,并通过降低脑血管内皮细胞的周细胞覆盖破坏卒中后脑功能的恢复^[2]。血浆中含量过高的脂质沉积在动脉内膜并刺激结缔组织增生,促进细胞因子分泌;高脂导致高黏滞血症,小动脉血细胞流速减慢甚至停滞,较小血管红细胞聚集,造成脑组织的相对缺血缺氧,高脂血症增加局灶性脑缺血后血-脑屏障(BBB)通透性和脑水肿^[3]。研究表明,高脂血症可引起大脑皮质海马区神经元线粒体嵴变短或消失^[4],那么,同样的,高脂血症是否会导致脑微血管内皮细胞线粒体结构及功能破坏,最终导致内皮细胞缺氧,内皮细胞间紧密连接蛋白重新分布,引起BBB通透性增加?为进一步研究高脂血症并发缺氧后脑组织的特异性血脑屏障功能改变,本实验通过高脂饮食建立高脂血症大鼠模型,观察高脂大鼠海马皮质脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白 Claudin-5 及血脑屏障通透性的变化,初步探讨脂毒性对脑微血管的影响。

材料与方 法

一、材料

正常健康 6~8 周龄雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 40 只,体重 150~200 g,普通级。购自川北医学院动物实验中心(实验动物生产许可证号:scxk(川 2008-18))。大鼠自由摄取净水,分笼饲养,每笼 5 只。rabbit Anti-Claudin-5 购于 Millipore 公司, rabbit Anti-HIF-1 α 购于北京博奥森公司, DAB 显色试剂盒及 SABC 兔 IgG, HRP (即用型) 购于武汉博士德生物工程公司。

二、实验方法

1. 实验动物分组: 8 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,

适应性喂养 1 周后随机分为高脂组 ($n=20$) 与正常对照组 ($n=20$), 分别予以高脂饲料和普通饲料喂养 8 周。普通饲料: 蛋白质占 23%, 碳水化合物占 53%, 脂肪占 5%。高脂饲料: 在 10 000 g 普通饲料中加入 150 g 食盐、2 000 g 花生、50 g 白糖、900 g 鸡蛋、2 000 g 猪油、400 g 麻油、达到碳水化合物 48%、脂肪 22%、蛋白质 20%, 由川北医学院实验动物饲料加工中心加工。

2. 检测项目: (1) 体重: 分别于基础水平时、4 周、8 周相同时间点在大鼠清晨空腹状态下, 测量其体重。(2) 血脂: 分别于基础水平时、4 周、8 周各测一次。大鼠禁食过夜, 乙醚麻醉后于眼眶内眦静脉采血约 3 ml, 标本立即置入真空无菌采血管中, 静置 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆, 送川北医学院附属医院检验科检测甘油三酯 (TG) 及总胆固醇 (TC)。(3) 免疫组化检测大鼠海马皮质 HIF-1 α 及 Claudin-5 的表达: 乙醚麻醉大鼠, 待麻醉生效后, 将大鼠仰卧, 剪开剑突下的皮肤、肌肉、腹膜至腹腔, 充分暴露膈肌, 剪开膈肌及两侧肋弓, 暴露胸腔及心脏, 分离心包及周围筋膜, 持钝针头从心尖处进针, 插入升主动脉, 固定针头并剪开右心耳, 打开灌注器, 快速灌注冰生理盐水, 见右心耳流出较清亮液体后, 换用 4% 多聚甲醛先快后慢灌注约 300 ml, 至大鼠双眼变白, 肢体和尾巴逐渐僵硬。断头取脑, 取 0.4 cm \times 0.4 cm 大小的大鼠海马皮质, 用 4% 多聚甲醛固定 20 h 后常规石蜡包埋。用微波行抗原修复, 修复方法: 高火 5 min, 低火 20 min, 并令其自然冷却。其余步骤按 SABC 试剂盒说明书进行。(4) BBB 通透性测定: BBB 的通透性是按照 Uyama 等^[5]的方法, 通过渗出血管外的伊文氏蓝 (Evans blue, EB) 含量来评价的。高脂组及普通组饲养 8 周后, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠 (250 mg/kg), 经股静脉注入 2% EB 生理盐水 (4 ml/kg) 1 h 后, 开胸通过左心室灌注生理盐水 (灌注压为 110 mmHg), 直到右心房流出的液体无色为止, 断头取脑, 分别取双侧颞叶及海马皮层, 样品称重并置入 50% 三氯乙

表2 各组大鼠血脂变化情况 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	TC			TG		
	基础值	4周	8周	基础值	4周	8周
高脂组	1.576±0.1389	1.706±0.1257	2.032±0.3650 ^{ab}	1.301±0.1172	1.670±1.0223	2.679±1.0876 ^{ab}
对照组	1.563±0.1152	1.522±0.0416	1.601±0.1012	1.393±0.1256	1.401±0.1140	1.544±0.1210
<i>t</i> 值	0.04	16.38	17.26	0.04	15.30	17.42
<i>P</i> 值	0.969	0.001	0.000	0.957	0.001	0.000

注:与本组4周时比较, ^a*P*=0.000; 与相同时间点对对照组比较, ^b*P*=0.000

酸溶液中。匀浆和离心(10 000 r/min, 20 min), 取上清液按 1:3 的比例用乙醇稀释。荧光值通过荧光分光光度计测得(激发波长 620 nm, 发射波长 680 nm)。根据 EB 溶液(100~500 mg/L)的外在标准绘出的 EB 与荧光值之间的线形成标准曲线, 得出脑组织中的 EB 含量, 并用 $\mu\text{g/g}$ 脑组织来表示。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 数据经正态检验后采用完全随机设计 *t* 检验。*P*<0.05 为有统计学差异。

结 果

1. 各组大鼠不同时间点空腹体重测量: 见表 1。

表1 各组大鼠体重变化情况 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	基础值	4周	8周
高脂组	20	165.00±12.100	280.00±13.200	401.30±66.827
对照组	20	163.00±10.100	250.00±10.200	321.10±18.300
<i>t</i> 值		0.36	8.22	15.25
<i>P</i> 值		0.717	0.001	0.000

2. 各组大鼠血脂水平: 见表 2。

3. 各组大鼠海马皮质 HIF-1 α 、Claudin-5 表达免疫组化观察: (1) 8 周时高脂组大鼠脑皮质微血管内皮细胞上, HIF-1 α 表达呈强阳性, 阳性染色主要位于胞浆、胞核, 阳性着色强于对照组 (*P*<0.05) (图 1); (2) 8 周时高脂组大鼠脑皮质微血管内皮细胞上 Claudin-5 表达呈弱阳性, 对照组大鼠 Claudin-5 呈强阳性表达 (*P*<0.05) (图 2, 表 3)。

表3 各组大鼠脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 及 Claudin-5 阳性细胞数 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	Claudin-5
高脂组	12±1.02	3±0.32
对照组	3±0.65	11±0.21
<i>t</i> 值	43.61	43.61
<i>P</i> 值	0.001	0.001

4. 8 周时各组大鼠脑组织 EB 含量测定: 8 周时高脂组大鼠 EB 含量较正常对照组升高, 差异有

统计学意义 (*P*<0.05), 见表 4。

表4 不同组别脑组织 EB 含量的比较 ($\mu\text{g/g}$ 脑组织, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EB 含量
高脂组	10	7.360±0.351 ^a
对照组	10	2.513±0.412

注:与正常对照组相比, ^a*P*=0.001

讨 论

高脂血症能引起血管、神经等多脏器组织结构与功能障碍, 但确切机制仍不十分明确。脂毒性是指过量的脂质在多个脏器和组织异位沉积并导致其功能损害。高脂使内膜呈玻璃样变性、纤维素样变性和脂质样变, 内皮细胞增生, 管腔内绒毛样突起, 内皮细胞间连接增宽, 造成内膜粗糙、管腔狭窄^[6], 导致微血管透明样物质沉积。许多研究发现, 高脂血症与神经退行性疾病如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、尼曼-匹克病 (Niemann-Pick disease, NPD) 等有一定相关性。由于 SD 大鼠遗传背景清楚, 繁殖能力强, 早期脂质代谢紊乱与人类特征相似, 故本研究选用 SD 大鼠建立高脂血症模型^[7]。经过 8 周的高脂饲养, 高脂模型组大鼠体重及空腹血脂水平明显高于相同时间点正常对照组, 免疫组化染色发现高脂组大鼠血管内皮细胞间紧密连接蛋白 Claudin-5 表达下调, BBB 通透性增加。高脂导致血液黏滞度增加, 微循环缺血缺氧, 基底膜增厚, 脑组织慢性持续缺氧。缺氧可导致细胞骨架重排, 且与 BBB 的破坏密切相关^[8-9]。既往有研究^[10]表明, 随着血胆固醇浓度的升高, BBB 的完整性可能会遭到破坏, 高胆固醇饮食致家兔 BBB 的通透性明显升高^[11]。由于一直以来海马和颞叶被认为是缺氧尤为敏感的特殊大脑结构^[12], 因此, 我们推测慢性高脂毒性所致大脑全面缺氧会引起反应性的 HIF-1 α 堆积于海马和颞叶。HIF-1 α 是缺氧状态下重要的转录调节因子, 根据亚单位结构与分布不同, HIF 存在三种亚型, HIF-1、HIF-2

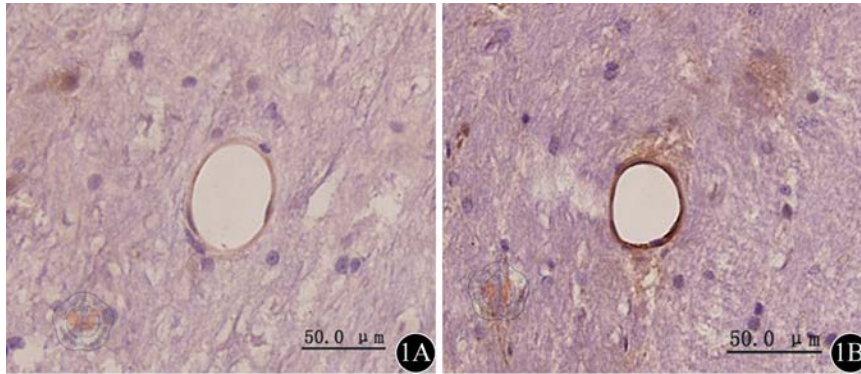


图1 各组大鼠海马皮质HIF-1 α 表达免疫组化(SABC \times 400)。1A: 正常对照组; 1B: 高脂组

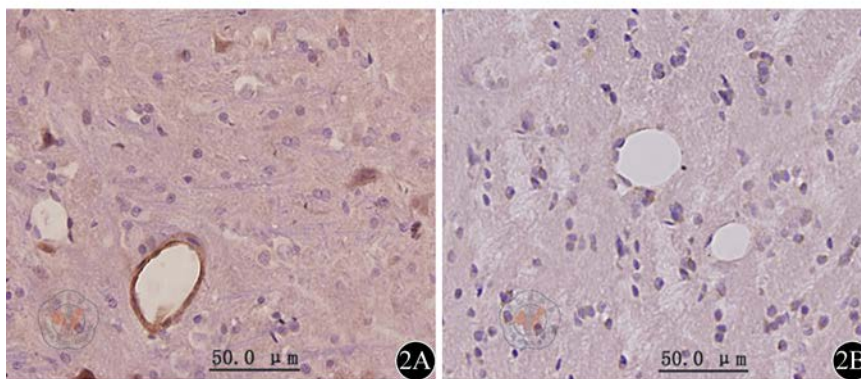


图2 各组大鼠海马皮质Claudin-5表达免疫组化(SABC \times 400)。1A: 正常对照组; 1B: 高脂组

和 HIF-3。当前对 HIF-1 的研究最为广泛, HIF-1 基因定位于 14q21~q24 染色体, 由 α 和 β 两个亚基所组成, 主要发挥生物学效应的是分子量为 120 000 的 HIF-1 α /低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)^[13]。超过 2% 人类基因直接或间接接受血管内皮细胞分泌的 HIF-1 α 调节。HIF-1 α 与 BBB 的破坏密切相关^[8,14], 2003 年的一项研究首先提出^[15], 在缺氧条件下转录因子 HIF-1 α 或 NF- κ B 是紧密连接蛋白的上游调质。Claudin-5 已经被证明是紧密连接中必不可少的组成蛋白质之一, 是脑微血管内皮细胞特异性蛋白^[16], 与 BBB 完整性密切相关。在脑组织中高表达, 是构成紧密连接的骨架蛋白^[17], 组合物中的紧密连接蛋白 Claudin 的种类直接决定了 BBB 功能, HIF-1 α 能减少紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达水平, 增加低分子量化合物细胞旁渗透性^[18], 高脂血症可引起内皮细胞损伤, 血管内皮细胞的完整性是维持正常血流状态、血管通透性及防御炎症反应的基础^[19]。研究表明^[20], 高脂血症可引起大脑皮质海马区神经元线粒体嵴变短或消失, 引起脑组织微循环病变, 高脂饲料喂养大鼠

使其 TG、TC 及人源氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)水平明显升高, 促进活性氧(ROS)产生, 增加细胞内氧化应激, 诱导内皮细胞凋亡, 激活 Caspase9 和 Caspase3 凋亡信号通路, 降低凋亡抑制蛋白如 Bcl-x1 和 Bcl-2 水平^[21]。高脂导致的微血管内皮细胞紧密连接蛋白的下调是否仅仅是高脂血症后期病理改变, 在 HIF-1 α 导致的 Claudin-5 表达下降的信号通路上, 是否有其他中间信号分子参与? 已有研究表明, 在高脂血症小鼠模型的缺血性微血管中, MMP-2 的表达被激活, 但是 MMP-2 激活可能加重了高脂血症引起的 BBB 的渗透性^[3] 以及在高脂血症早期, 机体是否存在保护机制及相关因子如脂联素、VEGF 等的表达, 高脂导致的肥胖及相关中枢并发症是否有免疫反应参与亟待进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Ayata C, Shin HK, Dileköz E, et al. Hyperlipidemia disrupts cerebrovascular reflexes and worsens ischemic perfusion defect[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(6): 954-962.
- [2] Zechariah A, Jin F, Hagemann N, et al. Hyperlipidemia attenuates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis, impairs

- cerebral blood flow, and disturbs stroke recovery via decreased pericyte coverage of brain endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1561-1567.
- [3] ElAli A, Doepfner TR, Zechariah A, et al. Increased blood-brain barrier permeability and brain edema after focal cerebral ischemia induced by hyperlipidemia: role of lipid peroxidation and calpain-1/2, matrix metalloproteinase-2/9, and RhoA overactivation[J]. *Stroke*, 2011, 42(11): 3238-3244.
- [4] 张振强, 李澎涛, 潘彦舒, 等. 高脂血症大鼠模型脑组织病理分析[J]. *河南中医*, 2012, 32(8): 988-991.
- [5] Uyama O, Okamura N, Yanase M, et al. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, 8(2): 282-284.
- [6] 赵意平, 张柏根. 糖尿病血管病变病理与病理生理改变及临床意义[J]. *中华全科医师杂志*, 2007, 6(11): 652-654.
- [7] 李林艳. 高脂血症对大鼠脑脂代谢的影响研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012: 1-57.
- [8] Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability?[J]. *High Alt Med Biol*, 2012, 13(3): 153-161.
- [9] McCaffrey G, Willis CL, Staats WD, et al. Occludin oligomeric assemblies at tight junctions of the blood-brain barrier are altered by hypoxia and reoxygenation stress[J]. *J Neurochem*, 2009, 110(1): 58-71.
- [10] Raffai RL, Weisgraber KH. Cholesterol: from heart attacks to Alzheimer's disease[J]. *Journal of Lipid Research*, 2003, 44: 1423-1430.
- [11] Xuesong Chen, Jeremy W Gawryluk, John F Wagener, et al. Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2008, 5(12): 1-14.
- [12] Jackson TC, Foster TC. Regional health and function in the hippocampus: evolutionary compromises for a critical brain region[J]. *Biosci Hypotheses*, 2009, 2(4): 245-251.
- [13] Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, et al. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: a possible role of HIF-1 α expression and oxygen metabolism[J]. *Diabetes*, 2011, 60(3): 981.
- [14] McCaffrey G, Willis CL, Staats WD, et al. Occludin oligomeric assemblies at tight junctions of the blood-brain barrier are altered by hypoxia and reoxygenation stress[J]. *J Neurochem*, 2009, 110(1): 58-71.
- [15] Witt KA, Mark KS, Hom S, et al. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(6): H2820-31.
- [16] Kuribayashi M, Wang J, Fujiwara O, et al. Lack of effects of 1439 MHz electromagnetic near field exposure on the blood-brain barrier in immature and young rats[J]. *Bioelectromagnetics*, 2005, 26(7): 578-588.
- [17] Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease[J]. *Histo Chem Cell Biol*, 2008, 130(1): 55-70.
- [18] Koto T, Takubo K, Ishida S, et al. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(4): 1389-1397.
- [19] 陈雁, 杨晓晶, 白海涛. 血管内皮损伤与修复的研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(17): 2573-2576.
- [20] 张振强, 李澎涛, 潘彦舒, 等. 高脂血症大鼠模型脑组织病理分析[J]. *河南中医*, 2012, 32(8): 988-991.
- [21] Li D, Mehta JL. Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis[J]. *Circ Res*, 2009, 104(5): 566-568.

(收稿日期: 2014-02-11)

(本文编辑: 戚红丹)

李芸, 柳弥, 吴碧华, 等. 高脂饮食对大鼠脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 及 Claudin-5 表达的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8(5): 909-913.

中 华 临 床 医 师 杂 志