

## · 基础研究 ·

## 高蛋氨酸饮食诱导大鼠H型高血压

刘凌云 肖宗慧 白宝玲 张勤

**【摘要】 目的:**观察高蛋氨酸饮食对大鼠血压和血同型半胱氨酸(Hcy)水平的影响。**方法:**8周龄雄性SD大鼠24只,随机分为3组:对照组、高蛋氨酸饮食组和高蛋氨酸饮食后叶酸回补组。对照组大鼠予普通饲料喂养16周,高蛋氨酸饮食组大鼠予蛋氨酸饲料(蛋氨酸为7.7 g/kg)喂养16周,高蛋氨酸饮食后叶酸回补组予蛋氨酸饲料喂养16周后,继续给予蛋氨酸叶酸饲料(蛋氨酸为7.7 g/kg,叶酸为100 mg/kg)喂养4周。每周记录各组大鼠的收缩压(SBP)。喂养结束后处死大鼠,检测血浆Hcy浓度。**结果:**实验结束时,对照组、高蛋氨酸饮食组和高蛋氨酸饮食后叶酸回补组的Hcy测值分别为4.03、6.16和4.91  $\mu\text{mol/L}$ , 3组间比较差异有统计学意义( $P=0.004$ )。喂养16周后,高蛋氨酸饮食组(149.8 mmHg)及高蛋氨酸饮食后叶酸回补组(150.0 mmHg)的SBP水平均高于对照组(120.0 mmHg)。叶酸喂养4周后高蛋氨酸饮食后叶酸回补组大鼠的血压降为115.5 mmHg,与对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论:**高蛋氨酸饮食可诱导大鼠发生H型高血压,叶酸可能有一定的治疗作用。

**【关键词】** 蛋氨酸;同型半胱氨酸;叶酸;H型高血压

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2023.02.011

**Methionine-rich diet induces hyperhomocysteine-associated hypertension in rats** LIU Lingyun, XIAO Zonghui, BAI Baoling, ZHANG Qin. *Biochemistry and Immunology Research Unit, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China*

**【Abstract】 Objective:** To explore the effect of methionine-rich diet on blood pressure and plasma homocysteine (Hcy) levels. **Methods:** Twenty male Sprague-Dawley rats (aged 8 weeks) were randomly divided into three groups as follows: control group, Hcy group and Hcy+folic acid group. Rats in the control group were fed with a regular diet and those in the Hcy group were fed with a methionine-rich diet (7.7g/kg L) for 16 weeks. Rats in the Hcy+folic acid group were fed with a methionine-rich diet for 16 weeks, followed by supplementary folic acid (100 mg/kg) for an additional four weeks. Body weight and systolic blood pressure were recorded weekly. All rats were sacrificed, and plasma Hcy levels were determined. **Results:** At the end of the experiment, plasma Hcy levels were 4.03, 6.16 and 4.91  $\mu\text{mol/L}$  in control group, Hcy group and Hcy+folic acid group, respectively, with significant differences among the three groups ( $P=0.004$ ). At 16 weeks, systolic blood pressure was higher in Hcy group (149.8 mmHg) and in Hcy+folic acid group (150.0 mmHg) compared to control group (120.0 mmHg). After an additional 4 weeks of folic acid feeding, systolic blood pressure decreased to 115.5 mmHg, which was not significantly different from that in control group ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** Methionine-rich diet induces Hcy-associated systolic hypertension in rats, and folic acid may have a therapeutic effect.

**【Keywords】** Methionine; Homocysteine; Folic acid; Hyperhomocysteine; Hypertension

H 型高血压是指伴有高同型半胱氨酸血症 (Hcy>10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的原发性高血压。中国卒中中一级预防研究的基线数据显示,我国 H 型高血压约占所有高血压患者的 80.3%<sup>[1]</sup>。Hcy 是一种含硫非蛋白质氨基酸,是蛋氨酸代谢过程中产生的重要中间产物。叶酸通过提供 5-甲基四氢叶酸来实现 Hcy 的再甲基化。血清 Hcy 升高是心血管疾病的危险因素之一,其与动脉粥样硬化、高血压和主动脉瘤等疾病有关,血浆 Hcy 从正常水平增至 5  $\mu\text{mol/L}$  可使心血管疾病的风险增加 20%<sup>[2]</sup>。Hcy 升高导致高血压的机制尚未完全明确,本研究使用高蛋氨酸饮食构建 H 型高血压动物模型,改良了 H 型高血压的建模方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

选取 SPF 级 8 周龄雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 327~339 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物质量合格证:110011220110904328)。将 SD 大鼠随机分为 3 组,即对照组、高蛋氨酸饮食组和高蛋氨酸饮食后叶酸回补组,每组 8 只。

### 1.2 干预方法

对照组给予普通饲料喂养 16 周,高蛋氨酸饮食组给予蛋氨酸饲料(蛋氨酸为 7.7 g/kg)喂养 16 周,之后处死对照组和高蛋氨酸饮食组大鼠。高蛋氨酸饮食后叶酸回补组给予蛋氨酸饲料喂养 16 周,然后给予蛋氨酸叶酸饲料(蛋氨酸 7.7 g/kg,叶酸 100 mg/kg)喂养 4 周。所有大鼠均自由进食饮水,饲养于北京维通利华实验技术有限公司。动物房内温度恒定为 (25±2) °C,相对湿度为 (55±5) %,照明情况为 12 h 光照,12 h 黑暗。

### 1.3 血压测定

在基线和喂养 5 周后每周使用无创尾部血压测量仪 BP-2000 测量大鼠收缩压(SBP)。预热仪器,用固定器对大鼠进行俯卧位固定,使其露出尾巴,安装并调整好压力感受器,设置参数(温度 38 °C,测

压次数 20 次),每只测量 20 次。前 10 次不进行记录,待大鼠处于安静状态,取脉搏波形稳定后测量的 10 次血压数据,去掉最高值和最低值后取平均值。

### 1.4 血浆 Hcy 等生化指标的测定

实验结束后,用一次性消毒注射器采集大鼠心脏血液样本,各取 10 mL 分别置于含有乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的试管中保存,3 000 转/min 离心 15 min,取上层血浆,采用全自动生化分析仪对大鼠的血浆样本进行血生化分析,测定 Hcy 及血脂水平。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 分析软件进行统计分析,计量资料采用均数±标准差表示,组间比较用独立样本 *t* 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验动物一般情况

24 只大鼠均状态良好。喂养过程中大鼠营养状况良好,皮毛光滑有光泽,但高蛋氨酸饮食组大鼠的性情较为烦躁。

### 2.2 各组大鼠体质量及其他血生化指标比较

高蛋氨酸饮食组大鼠的体质量 [(599.13±32.99) g] 低于高蛋氨酸饮食后叶酸回补组 [(667.88±31.81) g],与对照组 [(606.86±32.38) g] 的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。对照组与高蛋氨酸饮食组血生化指标差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。未对高蛋氨酸饮食后叶酸回补组进行血生化指标检测。见表 1。

### 2.3 各组大鼠 Hcy 水平比较

实验结束时,对照组、高蛋氨酸饮食组和高蛋氨酸饮食后叶酸回补组的 Hcy 水平分别为 4.03、6.16 和 4.91  $\mu\text{mol/L}$ ,3 组间比较差异有统计学意义 ( $P=0.004$ )。高蛋氨酸饮食组的 Hcy 水平高于对照组和高蛋氨酸饮食后叶酸回补组 ( $P$  均<0.05)。

表1 2组SD大鼠血生化指标水平比较

项目	对照组 ( $n=8$ )	高蛋氨酸饮食组 ( $n=8$ )
天冬氨酸转氨酶/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	141.50±65.51	124.49±148.94
肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	30.54±3.19	28.89±4.54
总胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.79±0.39	1.92±0.36
高密度脂蛋白胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.49±0.09	0.54±0.08
三酰甘油/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.32±0.37	1.55±0.52
低密度脂蛋白胆固醇/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.23±0.06	0.23±0.08

## 2.4 各组大鼠SBP的变化

与基线 SBP 测量值比较, 喂养至 16 周时高蛋氨酸饮食组及高蛋氨酸饮食后叶酸回补组的 SBP 测量值均明显升高 ( $P$  均 $<0.05$ ), 而对照组无明显

变化; 喂养 20 周时高蛋氨酸饮食后叶酸回补组的 SBP 水平降低, 与基线相比差异无统计学意义。各组大鼠不同时间 SBP 变化见表 2。

表2 各组大鼠不同时间尾动脉收缩压/mmHg

测量时间	对照组 ( $n=6$ )	高蛋氨酸饮食组 ( $n=6$ )	高蛋氨酸饮食后叶酸回补组 ( $n=6$ )	$P$
基线	117.00 $\pm$ 11.00	117.00 $\pm$ 11.00	117.00 $\pm$ 11.00	—
第6周	127.83 $\pm$ 9.56	138.00 $\pm$ 7.04	128.33 $\pm$ 4.97	0.13
第8周	118.33 $\pm$ 7.66 <sup>(2)</sup>	141.33 $\pm$ 4.27 <sup>(1)</sup>	141.50 $\pm$ 5.54 <sup>(1)</sup>	$<0.01$
第10周	119.17 $\pm$ 4.36 <sup>(2)</sup>	144.00 $\pm$ 2.61 <sup>(1)</sup>	139.67 $\pm$ 3.78 <sup>(1)</sup>	$<0.01$
第12周	111.50 $\pm$ 5.32 <sup>(2)</sup>	141.67 $\pm$ 3.01 <sup>(1)</sup>	141.67 $\pm$ 4.08 <sup>(1)</sup>	$<0.01$
第14周	118.17 $\pm$ 7.57 <sup>(2)</sup>	145.33 $\pm$ 6.86 <sup>(1)</sup>	147.17 $\pm$ 4.26 <sup>(1)</sup>	$<0.01$
第16周	120.00 $\pm$ 5.97 <sup>(2)</sup>	149.83 $\pm$ 3.13 <sup>(1)</sup>	150.00 $\pm$ 2.28 <sup>(1)</sup>	$<0.01$
第18周	—	—	123.00 $\pm$ 10.33 <sup>(2)</sup>	—
第20周	—	—	116.16 $\pm$ 4.36 <sup>(1)</sup>	—

注: 与对照组比较, <sup>(1)</sup> $P<0.05$ ; 与高蛋氨酸饮食组比较, <sup>(2)</sup> $P<0.05$

## 3 讨论

Hcy 是蛋氨酸的代谢产物<sup>[3]</sup>, Hcy 升高与心脑血管疾病密切相关<sup>[4-5]</sup>, 补充叶酸是目前最常用的降低 Hcy 的方法<sup>[6]</sup>。既往研究表明 Hcy 升高可导致氧化应激和内皮功能障碍<sup>[7-8]</sup>。Hcy 可促进氧自由基的形成, 抑制内皮细胞分裂。高水平的 Hcy 及其衍生物导致血脂代谢异常, 凝血和纤维蛋白溶解紊乱, 使血压升高, 加速高血压的发展和靶器官损害<sup>[9]</sup>。Hcy 诱导血管平滑肌细胞 (SMC) 增殖, 促进 SMC 合成胶原蛋白和生长因子 (如结缔组织生长因子), 还可以诱导 SMC 释放基质金属蛋白酶, 促使弹性蛋白降解。在外膜层, Hcy 刺激成纤维细胞合成胶原和基质金属蛋白酶, 并诱导炎症反应发生<sup>[10]</sup>。叶酸的保护机制与消除 Hcy 的组织毒性、抑制 NF- $\kappa$ Bp65/Rela/IL-6 信号通路、激活潜在的抗氧化应激通路有关<sup>[11]</sup>。

高血压是多因素疾病, 没有单一的动物模型可以模拟疾病发生的所有过程。既往高血压的动物模型已验证了 Hcy 在血压升高和终末器官损伤中的作用<sup>[12]</sup>。这些模型多使用大鼠, 其优势包括成本相对较低、啮齿类动物性成熟早、繁殖周期连续、术后恢复快速以及易于基因操作。然而, 啮齿动物模型也有许多局限性, 如高血压会在数天至数周内发展, 而人类则需要数年或数十年; 此外大多数研究均使用雄性动物<sup>[13]</sup>, 结果可能会受到性别差异的干扰。目前建立 H 型高血压模型的方法主要包括高蛋氨酸饮食、饮水喂养、胱硫醚  $\beta$  合成酶基因敲

除, 以及用叶酸、维生素 B6 或 B12 缺乏的饮食进行喂养等。其中, 高蛋氨酸饮食法较为常用, 饲料中蛋氨酸一般为 1.7%~3%, 6~20 周造模成功。但不同文献所报道的蛋氨酸含量、疗程以及采用的喂养方法都存在差异。有研究表明, 在给予 1 g/kg L- 蛋氨酸饮水 8 周后, 血压上升至 140 mmHg<sup>[14]</sup>。还有研究表明, 在给予 1.7% 左旋甲硫氨酸喂养后, 血压上升至 144.67 mmHg, 而在给予 0.008% 叶酸治疗 4 周后, 血压降至 119 mmHg<sup>[15]</sup>。

本实验采用 7.7 g/kg 蛋氨酸喂养大鼠, 16 周 Hcy 水平为 6.16  $\mu$ mol/L, 血压升高至 149.8 mmHg。本研究发现高蛋氨酸饮食组的 Hcy 及 SBP 水平均明显高于对照组, 表明 Hcy 升高时血压也会升高, 即 Hcy 的代谢异常可能会导致血压的升高; 补充叶酸后大鼠的 Hcy 及 SBP 水平均下降, 表明叶酸对 H 型高血压有治疗作用。另外, 本实验所用叶酸量为 100 mg/kg, 比既往研究报道的剂量大, 解决了血压升高不理想和单纯叶酸治疗时间过长的问题。有研究显示, 低叶酸饮食喂养会导致 Hcy 升高小鼠体重减轻, 并出现轻微的葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗, 可能与改变肠道微生物分布并增加了卟啉单胞菌科的相对丰度有关。这些发现为了解葡萄糖稳态失调和肠道菌群在 Hcy 升高相关并发症的发病机制中的作用提供了新的证据。目前, 关于叶酸在抗炎和免疫调节中的作用尚存在争议。有研究认为叶酸具有抗炎和免疫调节作用。Lei 等<sup>[16]</sup>发现叶酸可通过抑制血管生成、炎症反应和氧化应

激,发挥潜在的治疗作用。Christen 等<sup>[17]</sup>发现,叶酸、维生素 B6 和 B12 联合治疗可降低 Hcy 水平,但不会改变血管炎性生物标志物水平。

本研究表明高蛋氨酸饮食可以诱导大鼠 H 型高血压,补充叶酸后可以使其血压和 Hcy 水平下降。

### 参 考 文 献

- [1] Qin XH, Li YB, He ML, et al. Folic acid therapy reduces serum uric acid in hypertensive patients: a substudy of the China Stroke Primary Prevention Trial (CSPPT)[J]. *Am J Clin Nutr*, 2017, 105(4):882-889.
- [2] Marcucci R, Betti I, Cecchi E, et al. Hyperhomocysteinemia and vitamin B6 deficiency: new risk markers for nonvalvular atrial fibrillation[J]. *Am Heart J*, 2004, 148(3):456-461.
- [3] Ohishi T, Fujita T, Suzuki D, et al. Serum homocysteine levels are affected by renal function during a 3-year period of minodronate therapy in female osteoporotic patients[J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, 37(2):319-326.
- [4] Liu KJ, Xuekelati SYE, Zhou K, et al. Expression profiles of six atherosclerosis-associated microRNAs that cluster in patients with hyperhomocysteinemia: a clinical study[J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(3):189-198.
- [5] Peng HY, Man CF, Xu J, et al. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2015, 16(1):78-86.
- [6] Serapinas D, Boreikaite E, Bartkeviciute A, et al. The importance of folate, vitamins B6 and B12 for the lowering of homocysteine concentrations for patients with recurrent pregnancy loss and MTHFR mutations[J]. *Reprod Toxicol*, 2017, 72:159-163.
- [7] Zhang Z, Wei C, Zhou Y, et al. Homocysteine induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells via mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:5736506.
- [8] Wu X, Zhang LH, Miao Y, et al. Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis[J]. *Redox Biol*, 2019, 20:46-59.
- [9] Baszczuk A, Kopczyński Z, Thielemann A. Endothelial dysfunction in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2014, 68:91-100.
- [10] Balint B, Jepchumba VK, Guéant JL et al. Mechanisms of homocysteine-induced damage to the endothelial, medial and adventitial layers of the arterial wall[J]. *Biochimie*. 2020, 173:100-106.
- [11] Zhang LH, Li ZL, Xing CC, et al. The protective mechanism of folic acid on hyperhomocysteinemia-related arterial injury in spontaneously hypertensive rats: folic acid against arterial inflammation[J]. *Vascular*, 2022, 30(5):988-998.
- [12] Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova MK, et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems[J]. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(20):7698.
- [13] Sandberg K, Ji H, Hay M. Sex-specific immune modulation of primary hypertension[J]. *Cell Immunol*, 2015, 294(2):95-101.
- [14] Sowmya S, Swathi Y, Yeo AL, et al. Hydrogen sulfide: regulatory role on blood pressure in hyperhomocysteinemia[J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 53(3/4):138-143.
- [15] Shi L, Liu XY, Huang ZG, et al. Endogenous Hydrogen sulfide and ERK1/2-STAT3 signaling pathway may participate in the association between homocysteine and hypertension[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2019, 16(11):822-834.
- [16] Lei XW, Li Q, Zhang JZ, et al. The protective roles of folic acid in preventing diabetic retinopathy are potentially associated with suppressions on angiogenesis, inflammation, and oxidative stress[J]. *Ophthalmic Res*, 2019, 62(2):80-92.
- [17] Christen WG, Cook NR, Van Denburgh M, et al. Effect of combined treatment with folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in women[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(11):e008517.

( 收稿:2022-05-07 修回:2023-01-10 )

( 本文编辑:丁媛媛 )