

猫延髓头侧腹外侧区注射内皮素-1 对猫心血管活动的影响

杨新良¹, 富维骏², 侯钢星, 陈建国

(第二军医大学基础医学院生理学教研室, 上海 200433, 中国)

R972

Effect of endothelin-1 injected into rostral ventrolateral medulla on cardiovascular responses in cats

YANG Xin-Liang¹, FU Wei-Jun², HOU Gang-Xing, CHEN Jian-Guo (Department of Physiology, School of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)**KEY WORDS** endothelin-1; heart rate; blood pressure; medulla oblongata; metoprolol; phentolamine; sympathetic nervous system; vagotomy**ABSTRACT**

AIM: To study the effect of endothelin-1 (ET-1) in the rostral ventrolateral medulla (rVLM) on cardiovascular responses in cats. **METHODS:** The stereotatic technique and microinjection method were used. **RESULTS:** ET-1 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $0.5 \mu\text{L}$) microinjected into rVLM induced mean arterial pressure (MAP) increasing (3.7 ± 1.3) kPa, heart rate (HR) accelerating (29 ± 7) $\text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$, and renal nerve activity (RNA) intensifying $45 \% \pm 10 \%$. The effects were dose-dependent. Before and after bilateral vagotomy, there was no significant difference in the reaction of MAP, HR, and RNA. After intravenous injection with phentolamine ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, α -blocker), ET-1 did not induce significant change of MAP. ET-1 raised the content of peripheral plasma argipressin (Arg) from (12.4 ± 6.5) to (70.3 ± 24.2) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ with radioimmunoassay, and showed a

correlation with MAP changes. ET-1 induced heart rhythm disorder (HRhD) in acute myocardial ischemia, the occur time of HRhD was (4.8 ± 2.9) min, and the score was 4.4 ± 1.6 , and it was significantly different from control. **CONCLUSION:** ET-1 microinjected into rVLM could involve with control regulation of cardiovascular and sympathetic nerve activity.

关键词 内皮素-1; 心率; 血压; 延髓; 美托洛尔; 酚妥拉明; 交感神经系统; 迷走神经切断术

目的: 研究内皮素-1 (ET-1) 在猫延髓头侧腹外侧区 (rVLM) 对心血管活动的影响。 **方法:** 采用脑立体定向和脑内微量注射技术。 **结果:** rVLM 内微量注射 ET-1 ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.5 \mu\text{L}$) 后, 平均动脉压 (MAP) 升高 (3.7 ± 1.3) kPa, 心率增加 (29 ± 7) $\text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$, 肾神经活动增加 $45 \% \pm 10 \%$, 量-效呈正相关。 双颈部迷走神经切断后不影响上述结果。 静脉预先给予酚妥拉明 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著抑制 ET-1 的升压作用。 血浆精氨酸升压素 (Arg) 含量由 (12.4 ± 6.5) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 (70.3 ± 24.2) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 并与 MAP 变化显著相关。 使缺血心脏心律紊乱 (HRhD), HRhD 出现在结扎后 (4.8 ± 2.9) min, 评分为 4.4 ± 1.6 , 与对照组差异显著。 **结论:** rVLM 内注射 ET-1 影响了心血管和交感神经活动的中枢调节。

INTRODUCTION

内皮素 (ET) 是一种具有强大缩血管效应的生物活性肽, 静脉注射 ET 可导致平均动脉压 (MAP) 显著升高和严重的缺血心律紊乱 (HRhD)^[1]。 研究表明, ET 及其受体在中枢神经系统有广泛分布, 特别与心血管活动调节密切相关的脑区和核

¹ Now in 411th Hospital of the People's Liberation Army of China, Shunghai 200081, China.

² Correspondence to Prof FU Wei-Jun. Phn 86-21-6534-7018, ext 71343 or 86-21-6534-4331. Fax 65-21-6548-5341. E-mail JennyK@online.sh.cn

Received 1998-01-12

Accepted 1998-11-02

团, ET 及其受体含量极高^[2]. 侧脑室注射 ET 亦引起 MAP、心率(HR)和肾神经活动(RNA)的显著变化^[3-5]. rVLM 作为心血管活动的重要调节中枢, 内含丰富的 ET 及其受体^[6]. 本工作旨在研究 rVLM 内注射 ET-1 对心血管活动的影响.

MATERIALS AND METHODS

猫与一般手术处理 健康猫(第二军医大学动物房提供, Certificate No C92031), 107 只, 雌雄不拘, 体重为 2.2-3.5 kg. 实验前禁食 24 h, 饮水不限. 采用氯胺酮($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和 α -氯醛糖($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)复合麻醉. 猫麻醉后, 行气管分离插管, 以备人工通气. 在气管旁找出并分离出两侧迷走神经, 穿线备用. 右侧股动脉分离插管测量血压, 右侧股静脉分离插管给药和补液. 将心电图导联线联接于猫四肢, 在标准导联(II 导联)作心电图同步记录. 实验中, 用远红外恒温手术台保持猫体温在 37.5°C 左右; 5% 葡萄糖生理盐水(GNS)静脉滴入($6-10 \text{ 滴} \cdot \text{min}^{-1}$). 静脉注射 1% 的三碘季胺酚制动, 首次剂量 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. 实验中每隔 30 min 加半量($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). 调节呼吸频率与通气量, 使 P_{O_2} , P_{CO_2} 和 pH 值分别维持在 (13.5 ± 0.5) kPa, (4.7 ± 0.5) kPa 和 7.35 ± 0.01 (ABL-3 型血气分析仪, Radiometer). MAP, HR 和 HRh 由生理四道仪显示并描记. 美托洛尔上海信谊制药厂提供(批号 920316); 酚妥拉明瑞士(CIBA-GEIGY Limited basle, Switzerland/Suiza)进口.

核团定位和微量注射 猫头固定于江湾-I 型 C 立体定向仪上, 参照 Cirello^[7]报道, rVLM 定标为 P7.5-9.0, L 或 R2.5-3.5, H-8.5-9.0. 颅顶作一正中切口向尾侧至颅骨嵴, 在相当于左侧 rVLM 的颅骨表面处, 用骨钻(直径 2 mm)在颅骨上钻一小孔. 注药前, 骨孔用浸有生理盐水(NS)的小棉球堵塞. 将一 $5 \mu\text{L}$ 微量注射器固定于定向仪的电极架上, 用于向 rVLM 作微量注射. ET-1 (本教研室提供, 日本进口纯品, 日本大阪肽研究所, 批号 910911)用 NS 配制, 浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 本实验注射体积 $0.5 \mu\text{L}$, 含 ET-1 2 pmol, 在 1 min 内均匀缓慢注入.

肾神经分离及其活动记录 从左肋骨角向尾

端作一约 6 cm 的纵形切口, 在腰方肌和腹壁肌之间作分离术, 进入背侧腹膜后间隙, 找出左侧肾脏, 用拉钩将肾脏拉向腹侧, 充分暴露出肾动、静脉. 于肾动脉旁分离出一段肾神经, 长约 1-1.5 cm. 将分离好的肾神经搭放在双极银丝引导电极上(两极间距约 3 mm), 剪断外周端. 引导电极联接生理四道仪显示和记录 RNA. 实验结束后, 剪断中枢端, 记录肾神经电活动的零点水平, 在数据处理时作为参考.

血浆 Arg 含量放射免疫测定 分别于注药前 10 min 和注射 ET-1 后 10, 20, 40, 80 min 从股动脉取血, 一次 2 mL. 每取一次血后, 静脉推注 NS 2 mL 以补充失液量. 血标本用 edetic acid ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)抗凝, 抑肽酶($500 \text{ ku} \cdot \text{L}^{-1}$)防肽分解. 置普通冰箱 2 h 后, 离心($1000 \times g$, 10 min)分离出血浆, 送本校神经生物教研室测定.

急性心肌缺血模型制作和 HRhD 定量分析

于左侧第五肋间处作一约 6 cm 弧形切口, 分离、剪断胸壁和肋间肌, 打开胸腔暴露心脏, 剪开心包膜, 暴露左心耳及心前区, 在左心耳缘下 2 mm 处分离一段冠脉左前降支(LAD)穿线以备结扎. 根据室性心律失常在心电图的表现特征不同, 分为室性早搏(VPB)、室性心动过速(VT)、阵发性室性心动过速(PVT)和心室颤动(VF). 采用 Curtis 等^[8]所作评分表定量分析 HRhD.

统计与数据处理 实验结束后, 处死猫, 用 $0.5 \mu\text{L}$ 1% 的旁胺天蓝标记 rVLM 注射点, 位点准确者列入统计. 心肌标本送本校病理解教研室作石蜡切片做组织学鉴定, 急性缺血者列入统计. 血压以 MAP 表示; HR 以每 min 心搏次数表示; 肾神经活动以 % 表示, 注药前定为 100%; 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 用分组 *t* 检验判断两组均数间差异的显著性, 用直线相关分析判断两个变量间的相关关系.

RESULTS

MAP、HR 和 RNA MAP 于注药后 3-5 min 开始上升, 在注射后 20 min 达到峰值. 由注药前的 (15.1 ± 1.7) kPa 升高到 (18.9 ± 2.5) kPa, 升高了 (3.7 ± 1.3) kPa ($n=8$), 以后缓慢恢复, 在 100-120 min 恢复到注射前水平. HR 于注药后 3-5 min 开始增加, 在注射后 20 min 到达峰值, 由注药

前的(146 ± 16) beats·min⁻¹增加到(175 ± 18) beats·min⁻¹, 增加了(29 ± 7) beats·min⁻¹ (n = 8), 以后缓慢恢复, 在 100 - 120 min 减少到注射前水平。RNA 于注药后 3 - 5 min 开始增加, 在注药后 40 min 到达峰值, 由注药前的 100 % 增加到 145 % ± 10 %, 增加了 45 % ± 10 % (n = 8), 以后缓慢恢复, 但在注药后 100 - 120 min 时仍高于注射前水平。与对照组(NS, n = 6)比较, 差异有显著性(P < 0.01)。 (Fig 1)

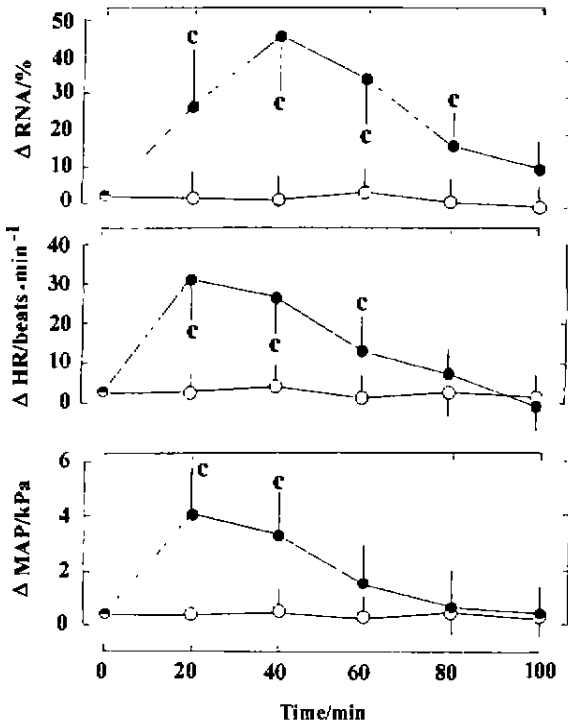


Fig 1. Effect of rVLM microinjection of ET-1 2 pmol on MAP, HR, and RNA increments. $\bar{x} \pm s$. *P < 0.01 vs control (NS). (○) NS (n = 6), (●) ET-1 (n = 8).

在 rVLM 前 2.0 - 2.5 mm 处的斜方体处 (P6.0, L3.0, H-8.5) 和临近面神经核的位点 (P8.0, L3.0, H-6.0) 分别注射 ET-1 2 pmol, 均不能引起 MAP、HR 和 RNA 的显著改变 (n = 5, P > 0.05)。

以 4 种递增剂量、相同体积 (0.5 μL) 的 ET-1 注入 rVLM, 可使 MAP、HR 和 RNA 逐步增加 (Tab 1)。

双侧迷走神经切断后, rVLM 注射 ET-1 所引

Tab 1. Effects of ET-1 0.5 μL injected into rVLM on MAP, HR, and RNA. $\bar{x} \pm s$. *P < 0.01 vs control (NS).

ET-1/ μmol·L ⁻¹	n	MAP/kPa	HR/ beats·min ⁻¹	RNA/%
Control	6	15.2 ± 1.8	146 ± 18	100 ± 0
0.5	5	15.8 ± 1.3	152 ± 12	112 ± 11
1.0	5	16.3 ± 1.9	161 ± 16 ^c	128 ± 14
2.0	5	17.5 ± 1.7 ^c	169 ± 18 ^c	140 ± 12 ^c
4.0	8	18.9 ± 2.5 ^c	175 ± 18 ^c	145 ± 10 ^c

起的 MAP、HR 和 RNA 的变化与双侧迷走神经完整组比较, 无显著差异 (n = 8, P > 0.05)。 (Tab 2)

Tab 2. Peak value of MAP, HR, and RNA induced by rVLM microinjection of ET-1 2 pmol before and after bilateral cervical vagotomy. $\bar{x} \pm s$. *P > 0.05 vs vagal nerve intact. ^fP < 0.01 vs control (NS).

	Vagal nerve intact		Vagotomy	
	Control (n = 6)	ET-1 (n = 8)	Control (n = 6)	ET-1 (n = 8)
MAP/kPa	15.2 ± 1.8	18.9 ± 2.5 ^f	15.7 ± 2.5	20.3 ± 2.2 ^{af}
HR/beats·min ⁻¹	146 ± 18	175 ± 18 ^f	145 ± 18	179 ± 24 ^{af}
RNA/%	100 ± 0	145 ± 10 ^f	100 ± 0	151 ± 13 ^{af}

静脉注射酚妥拉明 (5 mg·kg⁻¹) 后 1 min, MAP 由 (15.5 ± 2.5) kPa 降到 (12 ± 1.8) kPa; 心率由 (140 ± 16) beats·min⁻¹ 增加到 (200 ± 21) beats·min⁻¹; RNA 由 (100 % ± 0 % 增加到 180 % ± 42 % (n = 3), 持续 30 min。静脉预先注射酚妥拉明 1 min 后, rVLM 注射 ET-1, 不能使 MAP、HR 和 RNA 明显改变 (n = 6), 与对照组 (NS, n = 5) 比较, 差异无显著性 (P > 0.05)。

Arg rVLM 注射 ET-1 后 10 min, 血浆 Arg 含量即有升高, 在注射后 20, 40 min, 其含量分别为 (70.3 ± 24.2) ng·L⁻¹ 和 (38.8 ± 18.9) ng·L⁻¹ (n = 8), 与对照组 (NS, n = 6) 比较, 差异有显著性, 其变化亦和 MAP 变化相关 (r = 0.9317, P < 0.05)。 (Tab 3)

HRh ① rVLM 内微量注射 ET-1 后 10 min, 施假性结扎术, 8 只猫中, 3 只出现偶发性 VPB

**Tab 3. Effects of rVLM microinjection of ET-1 2 pmol on serum Arg in different time. $\bar{x} \pm s$.
^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control (NS).**

Time/min	Argipressin/ng·L ⁻¹	
	Control (n=6)	ET-1 (n=8)
Before administration	13.7±8.6	12.4±6.5 ^a
After administration		
10	14.1±7.5	23.2±11.2 ^a
20	12.3±7.2	70.3±24.2 ^c
40	13.4±9.1	38.8±18.9 ^b
80	15.4±10.3	20.2±11.9 ^a

(< 5 次·min⁻¹), HRhD 出现时间为结扎后(25.5±15.6) min (n=8), 评分为 0 (n=8); ② rVLM 内微量注射 ET-1 后 10 min, 结扎 LAD, 8 只猫中, 1 只出现频发 VPB, 4 只出现 PVT, 3 只出现 VF 并先后在结扎后 25-45 min 内发生死亡. HRhD 出现时间为(4.8±2.9) min (n=8), 评分为 4.4±1.6 (n=8); ③ rVLM 内微量注射 NS 0.5 μL 后 10 min, 结扎 LAD, 6 只猫中, 3 只出现 VPB, 1 只出现 PVT, 2 只出现偶发 VPB. HRhD 出现时间为结扎后(14.8±2.0) min (n=6), 评分为 1.8±0.9 (n=6) (Tab 4).

**Tab 4. Effects of ET-1 microinjected into rVLM and iv metoprolol on heart rhythm after LAD ligation. $\bar{x} \pm s$.
^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$ vs ET-1 + NS (iv).
^c $P < 0.01$ vs control (NS).**

Group	n	Score	Time/min	Death
ET-1 + LAD sham ligation	8	0±0	26±16	0
ET-1 + LAD ligation	8	4.4±1.6 ^f	4.8±2.9 ^f	3
NS + LAD ligation	6	1.8±0.9 ^f	14.8±2.0	0
ET-1 + metoprolol	6	2.4±2.0 ^b	19±10 ^b	2 ^a
ET-1 + NS (iv)	6	4.6±2.7	5.2±2.1	3

rVLM 内微量注射 ET-1 后 10 min, 结扎 LAD: ① 结扎前 3 min 静脉注射美托洛尔(1.5 mg·kg⁻¹, 10 mL), 6 只猫中, 1 只出现 VF, 2 只出现 PVT, 3 只出现 VPB. 其中 1 只出现 VF 和 1 只出现 PVT (45 min 时转为 VF)的猫先后在结扎后 35-60 min 内发生死亡; 3 只出现 VPB 的猫中有 2 只分别在 35 和 40 min 时转为 PVT. HRhD 出现时间为结扎后(19±10) min (n=6), 评分为 2.4±2.0 (n=

6); ② 结扎前 3 min 静脉注射 NS 10 mL, 6 只猫中, 3 只出现 VF, 2 只出现 VPB, 1 只出现 PVT. 3 只出现 VF 的猫先后在结扎后 20-55 min 内死亡. HRhD 出现时间为结扎后(5.2±2.1) min (n=6), 评分为 4.6±2.7 (n=6) (Tab 4).

DISCUSSION

实验表明, 当 rVLM 微量注射 ET-1 后, 能显著增强 RNA、升高 MAP 和增加 HR. 如预先静脉注射酚妥拉明, 则能有效地抑制 rVLM 内微量注射 ET-1 所致的 MAP 升高. 提示, 上述升压反应有外周儿茶酚胺机制参与. 交感神经活性的增强, 可使血浆儿茶酚胺的含量增加. rVLM 作为重要的心血管中枢, 内含大量的交感兴奋性神经元并发出纤维向下投射至脊髓中间外侧核, 能自发地发放紧张性冲动维持交感神经节前神经元的基础兴奋水平. 我们认为, rVLM 内微量注射 ET-1 所致的心血管和交感神经传出活动的改变, 可能与 ET-1 直接作用于 rVLM 内交感神经元, 从而增加其兴奋性有关. 众所周知, rVLM 是防御反应在延髓的接替站, 参与机体应激时的心血管反应. rVLM 内微量注射 ET-1 能显著升高 MAP, 同时增加 HR, 因此, rVLM 内微量注射 ET-1, 可能也激动了脑干的应激反应系统. Lecci 等^[5]报道, 双侧颈部迷走神经切断可增强侧脑室注射 ET 所致的升压效应. 实验中观察到, 切断颈部双侧迷走神经对 rVLM 内微量注射 ET-1 所致的 MAP、HR 和 RNA 的变化影响不显著. 这一结果可能与 ET-1 作用部位比较局限, 只作用于 rVLM 内交感神经元有关. 放射免疫测定发现, rVLM 内微量注射 ET-1 可使血浆 Arg 含量显著增加, 且与 MAP 的变化呈显著的正相关. 我们认为, rVLM 内微量注射 ET-1 所致的升压作用, 除影响下行交感神经传出性外, 由 rVLM 经视上核及室旁核所引起的神经-体液因素机制, 即 Arg 的释放, 也参与了升压反应.

研究发现, rVLM 内微量注射 ET-1 不能显著改变正常心脏搏动节律, 但可使缺血心脏发生严重 HRhD. Satinsky 等^[9]报道, 刺激正常心脏和阻塞冠脉的狗的下丘脑, 引起的 VF 有显著性差异, 后者是前者的 10 倍. 此作用可能与 rVLM 内微量注射 ET-1 兴奋交感中枢和激动脑干的应激反应系

统有关。进一步的研究还发现, β_1 -肾上腺素能受体阻滞剂美托洛尔对 rVLM 内微量注射 ET-1 所致 HRhD, 有一定的抑制作用, 但不能完全抑制恶性 HRhD 的发生, 或完全阻止其向恶性 HRhD 转变。文献报道, 中枢交感兴奋时的 VF 易感性, 能通过阻断 β_1 -肾上腺素能受体而明显降低^[10], 并且肾上腺素能受体阻滞剂可完全防止应激诱发的心脏易损性的改变^[11], 这与我们的研究结果不尽一致。我们认为, rVLM 内微量注射 ET-1 所致 HRhD, 可能还有其它机制的参与, 值得进一步研究。

REFERENCES

- 1 Yorikane R, Koike H, Miyake S. Electrophysiological effects of endothelin-1 on canine myocardial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17 Suppl 7: S159-62.
- 2 Koseki C, Imai M, Hirata Y, Yanagisawa M, Masaki T. Binding sites for endothelin-1 in rat tissues; an autoradiographic study. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13 Suppl 5: S153-4.
- 3 Nishimura M, Takahashi H, Matsusawa M, Ikegaki I, Nakanishi T, Hrabayashi M, *et al.* Intracerebroventricular injections of endothelin increase arterial pressure in conscious rats. *Jpn Circ J* 1990; 54: 662-70.
- 4 Makino S, Hashimoto K, Hirasawa R, Hattori T, Kageyama J, Ota Z. Central interaction between endothelin and brain natriuretic peptide on pressor and hormonal responses. *Brain Res* 1990; 534: 117-21.
- 5 Lecci A, Giuliani S, Santicoli P, Rovero P, Maggi CA, Giachetti A. Intracerebroventricular administration of endothelins; effects on the supraspinal micturition reflex and blood pressure in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol* 1991; 199: 201-7.
- 6 Gulati A, Rebello S. Down-regulation of endothelin receptors in the ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1991; 48: 1207-15.
- 7 Ciriello J, Caverson MM, Park DH. Immunohistochemical identification of noradrenaline- and adrenaline-synthesizing neurons in the cat ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 1986; 253: 216-30.
- 8 Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems; an examination of seven scores in an *in vivo* model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1988; 22: 656-65.
- 9 Satinsky J, Kosowsky B, Lown B, Kerzner J. Ventricular fibrillation induced by hypothalamic stimulation during coronary occlusion. *Circulation* 1971; 44 Suppl II: II-60.
- 10 Verrier RL, Calvert A, Lown B. Effect of posterior hypothalamic stimulation on ventricular fibrillation threshold. *Am J Physiol* 1975; 228: 923-7.
- 11 Lown B, Verrier RL, Rabinowitz SH. Neural and psychologic mechanisms and the problem of sudden cardiac death. *Am J Cardiol* 1977; 39: 890-902.

(责任编辑 杨如华)