

研究论文

慢性心力衰竭大鼠主动脉舒缩功能的变化及其机制

张宏丽, 赵 铭, 贺 熙, 江红轲, 于晓江, 马 欣, 臧伟进*

西安交通大学医学院药理学系, 西安 710061

摘 要: 为探讨心力衰竭诱导的血管舒缩功能紊乱的相关机制, 本实验对心梗后大鼠慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)模型胸主动脉血管环的舒缩功能变化及可能的病理学机制进行了研究。将 Sprague-Dawley 大鼠随机分为两组: 假手术(sham)组和慢性心衰(CHF)组。通过冠脉结扎法制作大鼠 CHF 模型。手术 10 周后, 检测大鼠血流动力学指标及相关参数, 之后迅速取出心脏并称重, TTC 染色法检测心肌梗面积。制备大鼠胸主动脉环, 利用敏感的肌张力描记技术, 比较 sham 组和 CHF 组胸主动脉环的舒缩功能, 观察血管环对 KCl、CaCl₂、苯肾上腺素(phenylephrine, PE)和咖啡因(cafeine)的收缩反应以及对乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)的舒张反应。并进一步研究一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂 *N*-硝基-L-精氨酸甲酯(*N*-nitro-L-arginine methylester, *L*-NAME)和非选择性环氧合酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂吲哚美辛(indomethacin, Indo)对两组胸主动脉环 ACh 的反应曲线的影响。结果显示: (1) 与 sham 组相比, CHF 组大鼠胸主动脉环对血管收缩剂 KCl (5~100 mmol/L)和 PE (1×10^{-8} ~ 3×10^{-4} mol/L)的反应性明显提高, 对血管舒张剂 ACh (1×10^{-12} ~ 1×10^{-4} mol/L)的反应性显著性降低($P < 0.01$, $P < 0.05$); (2) *L*-NAME (1 mmol/L)预处理后, CHF 组血管对 ACh (1×10^{-7} ~ 1×10^{-4} mol/L)介导的内皮依赖性收缩明显增强 ($P < 0.05$), 加入 Indo (10 μ mol/L)后该现象消失; (3)与 Indo 未处理组相比, Indo (10 μ mol/L)预处理后, CHF 组血管对 ACh (1×10^{-12} ~ 1×10^{-4} mol/L)介导的舒张反应明显增强($P < 0.05$); (4)在无钙 K-H 液中, 与 sham 组相比, CHF 组血管对 CaCl₂ (1×10^{-4} ~ 3×10^{-2} mol/L)介导的钙依赖性收缩曲线明显左移($P < 0.05$); cafeine (30 mmol/L)诱导的血管收缩未见显著性变化。以上结果表明, CHF 大鼠的胸主动脉血管环收缩异常与内皮功能障碍有关, 其机制可能是通过血管内皮细胞 COX 途径提高内皮收缩因子, 和(或)通过电压依赖性钙通道增加外钙流入引起血管收缩性能提高。

关键词: 慢性心力衰竭; 胸主动脉; 内皮功能障碍; 环氧合酶; 钙离子

中图分类号: R3

Alterations in aortic vasomotor function in rats with chronic heart failure and its mechanism

ZHANG Hong-Li, ZHAO Ming, HE Xi, JIANG Hong-Ke, YU Xiao-Jiang, MA Xin, ZANG Wei-Jin*

Department of Pharmacology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: The aim of the present study was to investigate the alterations in thoracic aortic vasomotor function in rats with chronic heart failure (CHF) post myocardial infarction (MI), and then explored the possible mechanism of pathological changes. Male Sprague-Dawley rats were divided into sham and CHF groups randomly. The CHF model group of rats was generated by ligating the left anterior descending artery. In sham-operated rats the ligation was placed but not tightened. A total of 20 rats underwent either sham-operated ($n=8$) or surgery for MI ($n=12$). All sham-operated rats survived the surgical procedure and the post-surgical period, whereas total mortality among MI-rats was 25% (3 out of 12). Only MI-rats with infarct-size >30% of the left ventricle (LV) were included for analysis (8 out of 9). Ten weeks after surgery, rats were anaesthetized for hemodynamic measurements, which contains systolic pressure, diastolic pressure, left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), $LV+dp/dt_{max}$ and $LV-dp/dt_{max}$. After that hearts were rapidly excised and weighed. Myocardial infarct size was determined by triphenyltetrazolium

Received 2010-03-17 Accepted 2010-05-27

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30930105, 30873058, 30770785), the National Basic Research Development Program of China (No. 2007CB512005) and China Medical Board Distinguished Professorships Award (No. F510000/G16916404).

*Corresponding author. Tel: +86-29-8265150, +86-29-82655003; E-mail: zwj@mail.xjtu.edu.cn

chloride (TTC) staining method. Isolated thoracic artery ring preparations were studied in a wire-myograph. The arterial constrictive responses to KCl, CaCl₂, phenylephrine (PE), and caffeine and the arterial diastolic responses to acetylcholine (ACh) were recorded by the Multi Myograph System. To explore the possible mechanism, nitric oxide synthase (NOS) inhibitor *N*-nitro-*L*-arginine methylester (*L*-NAME) and non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor indomethacin (Indo) were used. The results obtained were as follows: (1) CHF group showed an increased contraction response to KCl (5 – 100 mmol/L) and PE (1×10^{-8} – 3×10^{-4} mol/L), and a reduced endothelium-dependent relaxation response to ACh (1×10^{-12} – 1×10^{-4} mol/L) compared with those observed in sham group ($P < 0.01$, $P < 0.05$); (2) In the presence of *L*-NAME (1 mmol/L), the endothelium-dependent cumulative contractions to ACh (1×10^{-7} – 1×10^{-4} mol/L) was significantly enhanced in CHF group ($P < 0.05$), and this effect was reversed by pretreatment with Indo (10 μ mol/L); (3) In CHF group, the vessels incubated with Indo (10 μ mol/L) showed an increased vasodilation induced by ACh (1×10^{-12} – 1×10^{-4} mol/L) ($P < 0.05$); (4) In the Ca²⁺-free K-H solution, calcium-dependent contraction curves induced by CaCl₂ (1×10^{-4} – 3×10^{-2} mol/L) in CHF group significantly shifted to the left compared with sham group ($P < 0.05$); while the vascular contraction induced by caffeine (30 mmol/L) had no significant changes. These findings suggest that thoracic arteries of rats with CHF have endothelial dysfunction, and the contribution of endothelial dilation and contraction was significantly altered in CHF rats. The mechanism could be partly associated with the increased endothelium-dependent contracting factors by COX pathway, or the increased extracellular Ca²⁺ influx through voltage-operated channels, thus leading to elevated vasoconstriction.

Key words: chronic heart failure; thoracic artery; endothelial dysfunction; cyclooxygenase; calcium

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF, 心衰)是多种心血管疾病的严重或终末阶段,其发病率随着年龄的增加而逐渐上升,在世界范围内,它是导致死亡的主要心血管疾病之一。因此对于降低心衰发生率和死亡率的研究日益得到重视。血管结构和功能的损伤是高血压、糖尿病、冠心病等心血管危险因素早期血管改变,动脉血管功能对心衰的重要性已经得到了很好的认识^[1]。

近年来研究表明,血管内皮功能障碍在心衰的发病过程中起着非常重要的作用,并且可能是心衰患者病情恶化的重要因素之一。心衰时各组织器官缺血缺氧,通过引发脂质过氧化反应不断生成脂质过氧化物,从而损伤血管内皮细胞。而内皮细胞损伤时,血管的多种调节功能下降(如:血管张力,凝血和溶纤系统的平衡,血小板的凝集和活动,抗炎、抗氧化等),进而造成血管舒缩功能异常,动脉阻力增加,心肌细胞坏死,纤维化,心肌肥厚,心功能受损,最终导致心衰,心衰与血管损伤二者互为因果,形成恶性循环^[2-4]。因此在心衰过程中,血管的损伤越来越得到研究者的关注,本实验以大鼠离体胸主动脉环为标本,对正常大鼠和心梗后大鼠心衰模型血管环的功能学进行比较,并且初步探究这种病理性改变的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,体重(200±20) g,由西安交通大学医学

实验动物中心提供,自由饮水和摄食。

1.2 实验主要试剂 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、*N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯(*N*-nitro-*L*-arginine methylester, *L*-NAME)、吲哚美辛(indomethacin, Indo)、咖啡因(caffeine)、氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)均为美国 Sigma 公司产品;氯化钙(CaCl₂)、氯化钾(KCl)为西安化学试剂厂产品(分析纯)。

1.3 实验主要仪器 BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);超级恒温槽(宁波江南仪器厂);JH-280425 张力换能器(中国北京航天医学工程研究所);TG328B 电光分析天平(上海天平仪器厂)。

1.4 模型制备和实验分组 20 只大鼠随机分为假手术组(sham 组, $n=8$)和心衰组(CHF 组, $n=12$)。参照文献^[5]模型制备及验证的方法,通过结扎大鼠冠状动脉左前降支,构建左室心肌缺血模型。sham 组穿线不结扎冠状动脉。手术后的大鼠常规饲养 10 周,以术后大鼠的活动情况、精神状况、皮毛状况、体重变化及血流动力学指标来验证模型制备是否成功。术中及术后假手术组大鼠存活良好,而心衰组大鼠死亡 3 只(死亡率 25%)。由于过小的心梗面积并不会造成左心室功能障碍^[6],因此,将心梗面积小于 30% 的大鼠(1 只)排除,最终 sham 组大鼠 8 只,CHF 组大鼠 8 只。

1.5 大鼠血流动力学及心功能的测定 手术后 10 周,分别检测两组大鼠的血流动力学参数及相关指标。戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉大鼠后,用

充满肝素生理盐水的导管,钝性分离右颈总动脉,插管逆行至左心室,连接压力换能器,BL-410生物机能检测系统记录大鼠左室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP)、左室压力上升最大速度和压力下降最大速度($LV+dp/dt_{max}$, $LV-dp/dt_{max}$)。左侧股动脉插管测量血压。血流动力学参数检测完毕后,迅速摘取心脏并分离胸主动脉。心脏称重后,TTC染色后用面积法测定心肌梗死面积(infarct size)。

1.6 胸主动脉环等张收缩力记录 参考本实验室王胜鹏等^[7]的方法,快速取出胸主动脉后,放入通有95% O₂和5% CO₂混合气体的4℃ K-H液中,迅速剥除血管外膜表面脂肪及部分结缔组织,剪成长约3 mm的血管环。操作过程中注意保持内皮的完整性,并保证不同组内的血管环来自不同大鼠。将标本固定于两个L型的金属针上,其中一个连接张力换能器,另一个连接微调装置(调节负荷张力)。将安装好的动脉环置于盛有K-H液的标本槽内,K-H液成分(mmol/L)为:NaCl 119.0、KCl 4.7、CaCl₂ 2.5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ 1.2、NaHCO₃ 25.0和葡萄糖 10.0。实验过程中K-H液恒温于37℃,持续通入含95% O₂和5% CO₂的混合气体,使pH保持在7.4左右。实验之前,动脉环静息负荷2.5 g,每隔15 min换一次K-H液,平衡90 min。以高钾K-H液(含K⁺ 60 mmol/L)检验动脉环收缩性,两次收缩幅度相差<10%则用于实验。高钾K-H液组成为(mmol/L):NaCl 63.0、KCl 60.0、CaCl₂ 2.5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ 1.2、NaHCO₃ 25.0和葡萄糖 10.0,通5% CO₂和95% O₂混合气体30 min饱和。

各组血管环分别进行以下实验:(1)血管环对KCl累积浓度收缩反应的测定:按浓度累积法向浴槽K-H液中依次加入KCl,使其终浓度分别为5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mmol/L,记录不同浓度的KCl所致血管环最大收缩反应时张力。(2)血管环对PE ($1\times 10^{-8}\sim 3\times 10^{-4}$ mol/L)累积浓度收缩反应的测定:按浓度累积法向浴槽K-H液中依次加入PE,记录不同浓度的PE所致血管环最大收缩反应时张力。(3)血管环对ACh ($1\times 10^{-12}\sim 1\times 10^{-4}$ mol/L)内皮依赖性舒张反应的测定:在PE (1×10^{-6} mol/L)预收缩引起最大收缩张力后,按浓度累积法向浴槽K-H液中依次加入ACh,记录不同浓度的ACh所致血管环达最大舒张时张力。随后CHF组血管预先用Indo (10

μmol/L)孵育30 min后,观察对累计浓度的ACh的舒张反应。(4) L-NAME阻断后血管环对ACh ($1\times 10^{-7}\sim 1\times 10^{-4}$ mol/L)收缩反应的测定:血管环预先用L-NAME (1 mmol/L)孵育30 min后,按浓度累积法向浴槽K-H液中依次加入ACh,记录不同浓度的ACh所致血管环达最大收缩时张力。之后CHF组血管预先用Indo (10 μmol/L)孵育30 min后,观察对累计浓度的ACh的收缩反应。(5)血管环对CaCl₂ ($1\times 10^{-4}\sim 3\times 10^{-2}$ mol/L)累积浓度收缩反应的测定:将稳定后的血管在无钙K-H液中孵育30 min后,换成无钙高钾K-H液孵育20 min,浓度累积法加入CaCl₂,记录不同浓度的CaCl₂所致血管环最大收缩反应时张力。(6)血管环对caffeine收缩反应的测定:血管稳定后,换成无钙K-H溶液(含 5×10^{-5} mol/L EGTA)孵育20 min,加入caffeine (30 mmol/L)后记录血管环最大收缩时张力。每一步反应之间用K-H液反复冲洗3~5次,至张力回到基线后进行下一步实验。胸主动脉收缩反应以血管收缩力占KCl (60 mmol/L)预收缩时引起的最大收缩张力(E_{max})的百分比表示,舒张反应以血管舒张张力占PE (1×10^{-6} mol/L)预收缩时的最大收缩张力的百分比表示,并计算浓度累积效应曲线的半数抑制浓度(IC₅₀值),以其-Log值(pD₂)表示。

1.7 统计与分析 实验数据以means±SEM表示,n代表样本例数。采用SPSS13.0统计学软件进行统计分析,组间差异应用单因素方差分析(ANOVA-oneway),显著性差异进一步应用Student-Newman-Kuels检验比较,以P<0.05为有统计学意义。应用GraphPad Prism 5.0软件绘制图表。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及血流动力学变化

Sham组大鼠在实验期间饮食、活动正常,皮毛整洁,体重增长稳定。CHF组大鼠进食差,活动度明显下降,皮毛干燥无光泽,体重增长缓慢。手术10周后,与sham组相比,CHF组大鼠(心梗面积43%±4%)的体重有所降低,但没有显著性变化,心脏体重比(heart-to-body weight ratio)和LVEDP明显增加($P<0.05$, $n=8$),而 $LV+dp/dt_{max}$ 和 $LV-dp/dt_{max}$ 显著性下降($P<0.05$, $n=8$,表1)。

2.2 心衰后血管收缩剂KCl和PE的血管收缩反应性的变化

为了观察心衰后KCl及PE诱导的胸主动脉的收

表 1. 假手术组和心衰组大鼠心肌梗面积、各重量指数和血流动力学指标的比较

Table 1. Comparison of infarct size, weight index and hemodynamic parameters in sham rats and chronic heart failure (CHF) rats

	Sham rats (n=8)	CHF rats (n=8)
Infarct size (%)	—	43±4*
Body weight (g)	424±5	401±15
Heart weight (g)	1.3±0.05	1.4±0.04
Heart-to-body weight ratio (g/kg)	3.3±0.07	3.8±0.13*
Systolic pressure (mmHg)	121±9	107±7
Diastolic pressure (mmHg)	88±3	78±5
LVSP (mmHg)	126±17	106±16
LVEDP (mmHg)	5±1	11±2*
LV+dp/dt _{max} (mmHg/s)	8 771±303	5 568±273*
LV-dp/dt _{max} (mmHg/s)	-7 347±481	-4 479±498*

LVSP, left ventricular systolic pressure; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure; LV+dp/dt_{max}, first derivatives of left ventricular value of systolic and end-diastolic pressure; Data are expressed as means±SEM, n=8. *P<0.05 vs sham.

缩作用是否会有变化, 用浓度累积法分别加入 KCl 和 PE。结果显示, 非受体依赖性 KCl (5~100 mmol/L) 收缩曲线的 E_{max} 值由 sham 组的 108.24%±17.55% 上升到 CHF 组血管的 185.43%±15.46%, CHF 组血管对 KCl 诱导的累积剂量收缩反应明显增强(P<0.01, n=8), CHF 组与 sham 组的 pD₂ 值没有显著性差异(pD₂ 分别为 1.72±0.14, 1.77±0.16), KCl 剂量反应曲线与 sham 组相比非平行左移(图 1A); 受体依赖性 PE (1×10⁻⁸~3×10⁻⁴ mol/L) 收缩曲线的 E_{max} 值由 sham 组的 39.22%±12.20% 上升到 CHF 组血管的 61.26%±6.05%, CHF 组血管对 PE 诱导的累积剂量收缩反应也明显增强(P<0.05, n=8), pD₂ 值由 sham 组的 6.35±0.10 减少到 6.04±0.10 (P<0.05), PE 剂量反应曲线与 sham 组相比向左移位(图 1B)。

2.3 心衰后内皮依赖性血管舒张剂 ACh 的血管舒张反应性的变化

为了观察心衰后 ACh 诱导的胸主动脉的舒张作用是否会有变化, 在 PE (1×10⁻⁶ mol/L) 预收缩引起最大收缩张力后, 浓度累积法加入 ACh。结果显示, 内皮依赖性血管舒张剂 ACh (1×10⁻¹²~1×10⁻⁴ mol/L) 舒张曲线的 E_{max} 值由 sham 组的 79.66%±10.57% 下降到 CHF 组血管的 54.73%±6.24%, CHF 组血管对 ACh 诱导的累积剂量舒张反应明显减弱(P<0.05, n=8), CHF 组与 sham 组的 pD₂ 值没有显著性差异(pD₂ 分别为 7.22±0.13, 7.36±0.21), ACh 剂量反应曲线与 sham 组相比非平行右移(图 2)。

2.4 心衰对大鼠血管内皮依赖性收缩反应的影响

eNOS 通过产生 NO, 激活鸟苷酸环化酶(guanylate

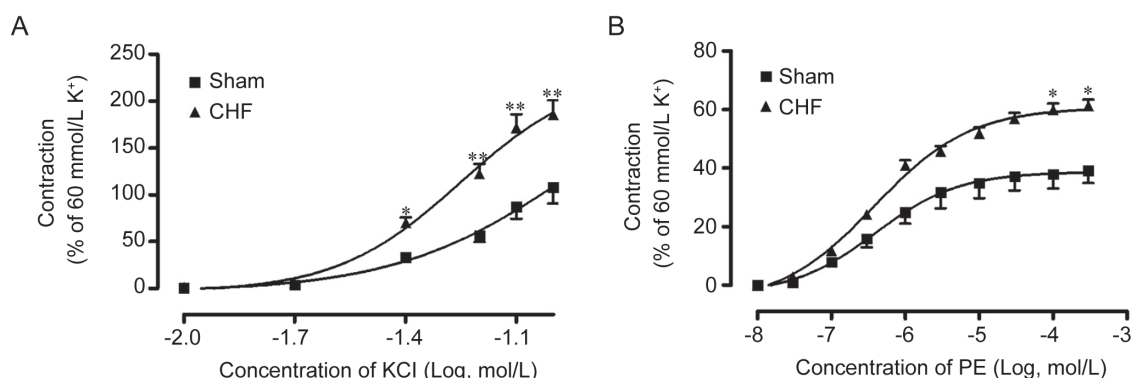


图 1. 胸主动脉对血管收缩剂 KCl 和 PE 的累积剂量反应曲线

Fig. 1. Contraction responses to cumulative doses of vascular contraction drugs (KCl and PE). A: KCl (5–100 mmol/L). B: PE (1×10⁻⁸–3×10⁻⁴ mol/L). The contraction responses are expressed as percentage of 60 mmol/L KCl-induced maximal vascular tension. Data are expressed as means±SEM, n=8. *P<0.05, **P<0.01 vs sham.

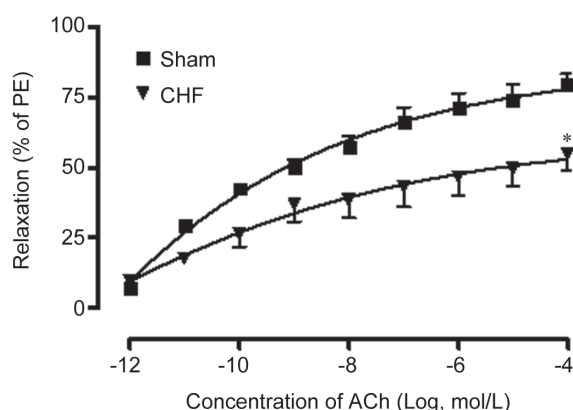


图 2. 胸主动脉对血管舒张剂ACh ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L)的累积剂量反应曲线

Fig. 2. Endothelium-dependent relaxation responses to cumulative doses of ACh ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) in thoracic aortic rings. The relaxation responses are expressed as percentage reduction of 1×10^{-6} mol/L PE-induced maximal vascular tension. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$. * $P<0.05$ vs sham.

cyclase, GC), 引起环磷酸鸟苷(cGMP)升高, 从而产生舒血管作用。为了观察eNOS阻断后血管的内皮依赖性收缩反应, 首先两组血管分别加入L-NAME (1 mmol/L), 浓度累计法加入ACh, 获得血管环反应性曲线。结果显示, 加入L-NAME阻断后, ACh ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L)剂量反应曲线的 E_{max} 值由sham组的 $3.03\% \pm 2.18\%$ 明显提高至CHF组的 $28.66\% \pm 8.71\%$, CHF组血管对ACh诱导的累积剂量收缩反应明显增强($P<0.05$, $n=8$), 而当CHF组血管用L-NAME (1 mmol/L)+Indo (10 μ mol/L)预孵育30 min后, ACh诱导的收缩反应没有出现, 三组的 pD_2 值没有显著性差异(图3)。

2.5 非选择性COX抑制剂Indo对CHF组血管环反应性的影响

CHF组血管加入非选择性COX阻断剂Indo (10 μ mol/L)孵育30 min, 在PE (1×10^{-6} mol/L)预收缩引起最大收缩张力后, 浓度累积法加入ACh, 获得血管环反应性曲线。结果显示, CHF+Indo组与CHF组相比, ACh ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L)舒张曲线的 E_{max} 值由 $54.73\% \pm 16.24\%$ 提高到 $74.02\% \pm 17.15\%$, 有明显的改善作用($P<0.05$, $n=8$), 接近sham组水平($79.66\% \pm 10.57\%$), 三组的 pD_2 值没有显著性差异(图4)。该结果提示加入非选择性COX阻断剂Indo, 对CHF组血管ACh的舒张反应有一定的改善。

2.6 心衰后CaCl₂的血管收缩反应性的变化

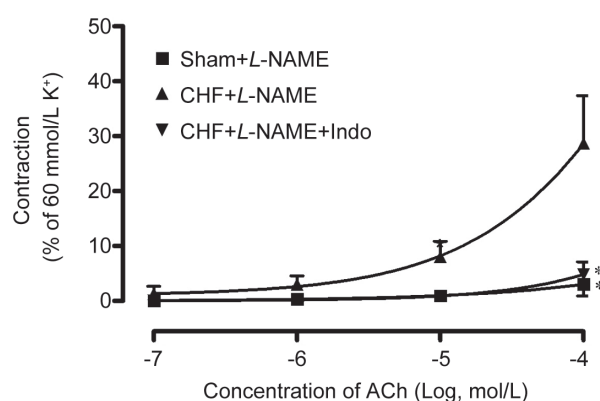


图 3. L-NAME存在时动脉血管环对ACh浓度依赖收缩反应性曲线

Fig. 3. Endothelium-dependent cumulative contractions to ACh ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) in the rings of rat aorta in the presence of L-NAME (1 mmol/L). The contraction responses are expressed as percentage of 60 mmol/L KCl-induced maximal vascular tension. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$. * $P<0.05$ vs CHF+L-NAME group.

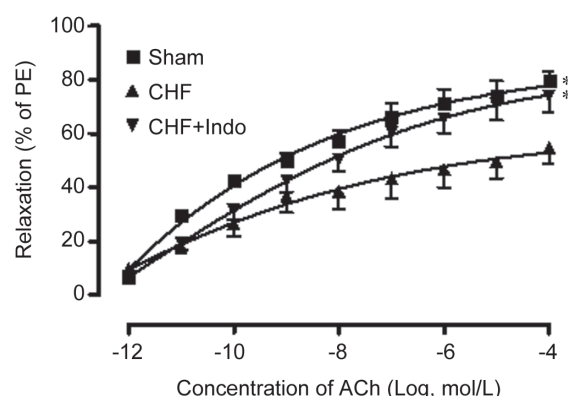


图 4. Indo对ACh引起PE预收缩血管环浓度依赖舒张反应性曲线的影响

Fig. 4. Relaxations to increasing concentrations of ACh ($1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) in rings contracted with PE in two groups, with or without preincubation of Indo (10 μ mol/L). The relaxation responses are expressed as percentage reduction of 1×10^{-6} mol/L PE-induced maximal vascular tension. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n=8$. * $P<0.05$ vs CHF group.

之前的结果表明心衰后胸主动脉功能的改变与COX有关, 而钙是COX通路的上游信号物质, 为了探讨钙是否影响心衰后血管的收缩作用, 将稳定后的血管在无钙K-H液中孵育30 min后, 换成无钙高钾K-H液孵育20 min, 浓度累计法加入CaCl₂ ($1 \times 10^{-4} \sim 3 \times 10^{-2}$ mol/L), 获得血管环收缩反应性曲

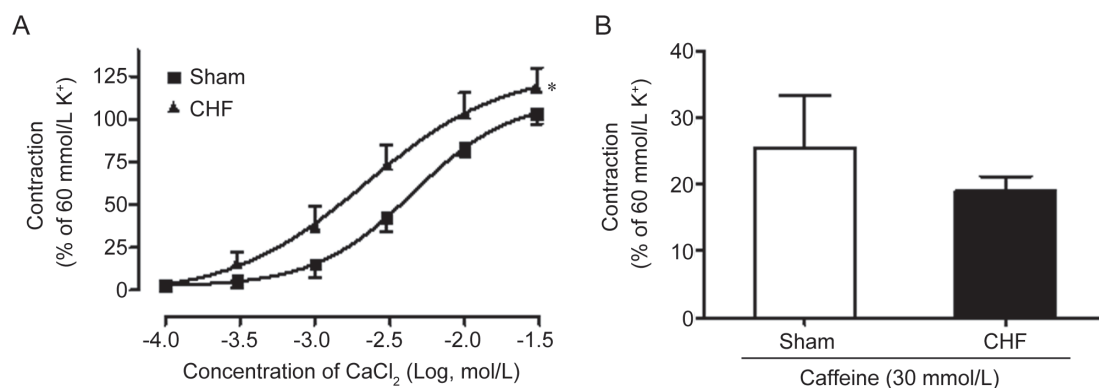


图 5. 胸主动脉对钙的收缩反应性

Fig. 5. The contractile effects of calcium to thoracic aortic rings. A: Contraction responses to cumulative doses of CaCl₂ (1×10^{-4} – 3×10^{-2} mol/L). Concentration–response curves for CaCl₂ were determined in Ca²⁺-free solution containing KCl (60 mmol/L). Compared to that in sham group, the sensitivity of vessels of CHF group to CaCl₂ markedly increased. * $P < 0.05$ vs sham. B: The contractile effects of caffeine (30 mmol/L) on two group vessels. The data have no significant differences between two groups. Data are expressed as means $\pm$ SEM, $n = 8$.

线。结果表明, CHF 组血管与 sham 组相比, CaCl₂ 收缩反应曲线的 pD_2 值由 2.43 ± 0.11 增加到 2.72 ± 0.12 , CHF 组血管对钙的敏感性提高($P < 0.05$, $n = 8$), 表现为浓度依赖曲线向左移(图 5A)。

2.7 兰尼丁(Ryanodine)受体开放剂 caffeine 对血管内钙释放的影响

为了观察作为细胞内钙释放途径之一的Ryanodine 受体是否会影响 CHF 组血管的舒缩功能, 将稳定后的血管换成无钙 K-H 溶液孵育 20 min, 加入 caffeine (30 mmol/L)收缩血管。结果显示, sham 组和 CHF 组对 caffeine 介导的收缩反应无显著性差异(E_{max} 值分别为 $18.95\% \pm 4.58\%$, $25.53\% \pm 15.98\%$, $P > 0.05$, 图 5B)。

3 讨论

血管内皮细胞损伤后, 内皮舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)和内皮收缩因子(endothelium-derived contracting factor, EDCF)释放失衡, 造成血管舒缩功能异常。本研究结果表明心肌梗后大鼠心衰模型胸主动脉环对血管收缩剂KCl和PE的反应性明显提高, 而对内皮依赖的血管舒张剂ACh的反应性显著性降低。在 CHF 组血管, Indo 既可以显著性降低 L-NAME 存在时 ACh 诱导的内皮依赖性收缩, 也可以显著性增加 PE 预收缩后 ACh 诱导的血管舒张。CHF 组血管 CaCl₂ 诱导的钙依赖性收缩曲线明显左移, 而 caffeine 诱导的血管收缩未见显著性变化。表明心衰后血管存在内皮功能障碍, 与文献报道一致^[8,9]。

本室前期的研究较多关注于不同干预手段对缺血性心脏病中心肌缺血的保护机制^[10], 而本文拟以其造成的血管病变为研究重点。CHF 后, 心肌灌注、心肌工作负荷以及外周血管阻力等因素会导致冠脉、周围血管、大的传导动脉等出现内皮功能障碍。总体上来说, 心衰的加重, 会引起血管内皮功能障碍的损害程度随之加重, 这种可能的时间依赖性关系已被文献^[11]证实。然而 Baggia 等的研究^[12]提示, 在心衰大鼠的发病过程中, 不同血管床的内皮功能损伤程度有明显差异, 提示心衰导致的内皮功能障碍还具有血管依赖性的特点。

血管内皮是调节血管舒缩的主要因素, 它通过内皮细胞释放血管活性物质调节血管平滑肌的张力。内皮细胞中释放的两种重要的物质是 EDRF 和 EDCF。前者的活性形式主要是 NO, 其在 NOS 催化下由 L-精氨酸生成, 通过激活可溶性 GC 合成 cGMP 发挥其舒张血管的作用^[13-15]。NO 作为一种内皮源性舒张因子, 在维持血管静息张力起重要作用。Malmsjo 等^[16]报道在大鼠心衰模型中, 由 NO 介导的血管舒张显著性降低。Indik 等^[17]指出心衰后的血管产生大量的超氧化物歧化酶(SOD), 造成对 NO 的耗竭, 使血管发生内皮功能障碍。事实上, 内皮细胞释放的 EDCF 对血管的舒缩功能也有非常重要的作用。COX 合成的产物介导了内皮依赖的收缩^[18]。COX 将花生四烯酸代谢为内过氧化物, 然后再将其降解为前列环素(prostacyclin)、血栓素 A2 (thromboxane A2)、前列腺素 E2 (prostaglandin E2) 等物质, 激动平滑肌细胞膜上的血栓素-前列腺素

受体(TP受体),引起平滑肌收缩^[19]。内皮细胞上COX-1、COX-2、前列环素合酶、血栓素合酶表达的提高以及平滑肌上TP受体敏感性增加都可以加剧EDCF介导的收缩。EDCF的研究主要集中于高血压和糖尿病模型,在本研究中,L-NAME按照文献^[20]选择100 μmol/L剂量时,CHF组血管未发现ACh引起的收缩,当剂量增大到1 mmol/L,在ACh较大浓度时CHF组血管出现明显收缩,提示虽然内皮收缩因子在心衰血管上的表达可能低于高血压和糖尿病大鼠模型,但与sham组相比,其表达有明显提高。用非选择性COX抑制剂Indo阻断COX通路时,CHF组血管的ACh舒张反应明显得到改善,该结果也从另一个角度证实了心衰后血管内COX通路的相关物质表达提高,引起血管环收缩性增强。钙是COX通路的上游物质,本研究发现心衰后血管增加了细胞外钙的流入,此结果提示胞内钙浓度(cytosolic calcium concentration, $[Ca^{2+}]_c$)的提高可能会激活COX通路。

Ca^{2+} 在肌细胞兴奋-收缩耦联中起关键作用,参与调节肌细胞的舒缩活动^[21]。血管平滑肌收缩所需要的 Ca^{2+} 源于胞外流入和胞内释放。钙流入途径主要有受体操作性钙通道(receptor-operated Ca^{2+} channel, ROC)、电压依赖性钙通道(voltage-dependent Ca^{2+} channel, VDC)和静息时的 Ca^{2+} 内流,经后一途径内流的 Ca^{2+} 量很少,基本可以忽略不计。细胞内钙的释放主要来自肌浆网(SR),其释放机制有两种:(1) IP_3 诱导的钙释放机制(IP_3 induced calcium release, IP_3 CR),控制通道开放的受体为 IP_3 受体;(2)钙诱导的钙释放机制(calcium induced calcium release, CICR),控制通道开放的受体为Ryanodine受体,可选择性的被caffeine激活,从而升高平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度。当受体被激活开放时,就可导致钙离子从肌浆网内释放出来,从而升高 $[Ca^{2+}]_c$,引起血管环的收缩^[22]。最常用的两种增加血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_c$ 的方式是高 K^+ 诱导的细胞膜超极化,以及有收缩效应的激动剂如PE引起受体的激活^[23]。KCl通过诱导平滑肌细胞超极化,钙离子通道开放,细胞外 Ca^{2+} 内流引起血管收缩^[24]。PE主要是通过作用于 α_1 肾上腺素受体,激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC)产生甘油二酯(diacyl glycerol, DAG)和 IP_3 , DAG进而通过蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)激活肌球蛋白轻链,促进血管平滑肌细胞肌球蛋白和肌动蛋白的相互作用,引起血管收缩^[24,25]; IP_3 通过激活 IP_3 受体使肌

浆网内 Ca^{2+} 释放,升高细胞内钙,导致血管平滑肌收缩^[26]。与sham组相比,在无钙K-H液中浓度累积加入 $CaCl_2$ 后CHF组血管通过电压依赖性钙通道使外钙内流,明显增加细胞内钙浓度,而caffeine诱导的 IP_3 受体非依赖的内钙释放引起的血管环收缩,没有显著性差异,提示心衰后血管可能通过电压依赖性钙通道增加 $[Ca^{2+}]_c$,而caffeine诱导的内钙释放途径没有改变。

本研究结果表明,大鼠心衰模型的胸主动脉环对血管收缩剂的反应性明显提高,而对内皮依赖的血管舒张剂的反应性明显降低,这种改变可能与血管内皮细胞COX途径提高内皮收缩因子,和(或)电压依赖性钙通道增加外钙流入引起血管收缩性能提高有关。这一结果提示在临床预防及治疗上,可以血管功能为指标,针对心衰患者的血管异常的靶位进行早期检测与治疗,积极有效地防治血管病变。

参考文献

- 1 Cheriyan J, Wilkinson IB. Role of increased aortic stiffness in the pathogenesis of heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2007; 4 (3): 121-126.
- 2 Bank AJ, Lee PC, Kubo SH. Endothelial dysfunction in patients with heart failure: relationship to disease severity. *J Card Fail* 2000; 6(1): 29-36.
- 3 Linke A, Recchia F, Zhang XP, Hintze TH. Acute and chronic endothelial dysfunction: implications for the development of heart failure. *Heart Fail Rev* 2003; 8(1): 87-97.
- 4 Sharma R, Davidoff MN. Oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure. *Congest Heart Fail* 2002; 8(3): 165-172.
- 5 Xu J, Carretero OA, Lin CX, Cava sin MA, Shesely EG, Yang JJ, Reudelhuber TL, Yang XP. Role of cardiac overexpression of ANG II in the regulation of cardiac function and remodeling postmyocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(3): H1900-H1907.
- 6 Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Etcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44(4): 503-512.
- 7 Wang SP, Zhang Y, Wier WG, Yu XJ, Zhao M, Hu H, Sun L, He X, Wang YH, Wang B, Zang WJ. Role of store-operated Ca^{2+} entry in adenosine-induced vasodilatation of rat small mesenteric artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(1): H347-H354.
- 8 Poelzl G, Frick M, Huegel H, Lackner B, Alber HF, Mair J, Herold M, Schwarzacher S, Pachinger O, Weidinger F. Chronic heart failure is associated with vascular remodeling of the brachial artery. *Eur J Heart Fail* 2005; 7 (1): 43-48.

- 9 Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GYH. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure - Relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation* 2004; 110 (13): 1794-1798.
- 10 Zang WJ (臧伟进), Sun L, Yu XJ, Lv J, Chen LN, Liu BH. Vagal control of cardiac functions and vagal protection of ischemic myocardium. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2008; 60(4): 443-452 (Chinese, English abstract).
- 11 Teerlink JR, Clozel M, Fischli W, Clozel JP. Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22(2): 615-620.
- 12 Baggia S, Perkins K, Greenberg B. Endothelium-dependent relaxation is not uniformly impaired in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29(3): 389-396.
- 13 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-142.
- 14 Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3(9): 2007-2018.
- 15 Guo YM (郭益民), Zhu XN, Pan JY. Nitric oxide changes aortic function in rats with renal hypertension. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2000; 52(3): 243-246 (Chinese, English abstract).
- 16 Malmström M, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D. Enhanced acetylcholine and P2Y-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43(1): 200-209.
- 17 Indik JH, Goldman S, Gaballa MA. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(4): H1767-H1770.
- 18 Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291 (3): H985-H1002.
- 19 Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol* 2009; 196(2): 193-222.
- 20 Matsumoto T, Kakami M, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Imbalance between endothelium-derived relaxing and contracting factors in mesenteric arteries from aged OLETF rats, a model of Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(3): H1480-H1490.
- 21 Bolton TB, Gordienko D V, Pucovsky V, Parsons S, Povstyan O. Calcium release events in excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Novartis Found Symp* 2002; 246: 154-168.
- 22 McCarron JG, Bradley KN, MacMillan D, Muir TC. Sarcolemma agonist-induced interactions between InsP_3 and ryanodine receptors in Ca^{2+} oscillations and waves in smooth muscle. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 920-924.
- 23 Karaki H, Ozaki H, Horri M, Mitsui-Sato M, Amano K, Harada K, Miyamamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49(2): 157-230.
- 24 Cao CM (曹春梅), Ye S, Yu H, XU QS, Ye ZG, Shen YL, Lu Y, Xia Q. Interleukin-2 induced endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2003, 55(1): 19-23 (Chinese, English abstract).
- 25 Zhou SH (周寿红), Ling HY, Tian SW, Liu XQ, Wang BX. 17β -estradiol protects against injury of aortic relaxation and contraction in ovariectomized rats with insulin resistance induced by fructose. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2005; 57(5): 627-635 (Chinese, English abstract).
- 26 Iwama K, Nakajo S, Aiuchi T, Nakaya K. Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERK and the Ca^{2+} -dependent production of superoxide. *Int J Cancer* 2001; 92(4): 518-526.