

· 论 著 ·

脑钠肽对猪冠状动脉的舒张作用及机制研究*

李其勇, 姜荣建[△], 舒燕, 孔洪, 赖金川, 程标

(四川省人民医院心内科, 成都 610072)

摘要:目的 观察脑钠肽(BNP)对猪冠状动脉舒张作用,探讨其扩血管机制。方法 采用猪冠状动脉环张力测定法,观察脑钠肽对猪冠状动脉的舒张作用及 C 型利钠肽受体(NPR-C)拮抗剂 cANF4-28、鸟苷酸环化酶抑制剂 1H-(1,2,4)恶二唑(4,3- α) 喹啉啉-1-酮(ODQ)和各种钾离子通道阻滞剂对其舒血管效应的影响。结果 10^{-6} mol/L 的 BNP 对血管的最大舒张率为(68.5 \pm 11.5)% , ODQ、四乙胺或格列苯脲均能明显抑制脑钠肽的舒血管作用($P < 0.05$) , cANF4-28 对 BNP 的舒张血管作用无明显影响($P > 0.05$)。结论 BNP 可通过激活 BKCa 和 KATP 对猪冠状动脉产生舒张作用。

关键词:利钠肽, 脑; 冠状血管; 钾通道

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.06.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)06-0527-02

Vasodilatory effects and mechanisms of brain natriuretic peptide in porcine coronary artery*

Li Qiyong, Jiang Rongjian[△], Shu Yan, Kong Hong, Lai Jinchuan, Cheng Biao

(Department of Cardiology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

Abstract: Objective To investigate the vasodilatory effects and mechanisms of brain natriuretic peptide (BNP) in porcine coronary artery. **Methods** This study was performed on the porcine coronary artery rings. The tension changes of coronary artery ring were recorded with the presence of BNP, further NPR-C antagonist (cANF4-28), guanylate cyclase antagonist (ODQ) and four types of potassium channel blocker were used to explore the vasodilatory mechanisms. **Results** The maximum vascular relaxation rate of 10^{-6} mol/L BNP was (68.5 \pm 11.5)%. ODQ, tetraethylammonium or glibenclamide all could inhibit the vascular relaxant activity of BNP ($P < 0.05$), however the action of BNP was not affected by cANF4-28. **Conclusion** BNP relaxes the coronary artery of porcine by activating BKCa and KATP.

Key words: natriuretic peptide, brain; coronary vessels; potassium channels

脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)是主要由心室肌细胞分泌的含 32 个氨基酸的小分子肽,可与 A 型利钠肽受体(A-type natriuretic peptide receptor, NPR-A)结合通过鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GCs)/蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG)途径发挥扩血管作用^[1]。C 型利钠肽受体(C-type natriuretic peptide receptor, NPR-C)既往被称为“清除受体”,但新近 Villar 等^[2]发现 C 型利钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)可结合 NPR-C 舒张鼠主动脉和肠系膜动脉, BNP 是否也能结合 NPR-C 发挥生物学效应目前尚不清楚。

钾离子通道是决定平滑肌细胞膜电位的重要因素,钾离子通道开放导致细胞膜超极化,通过抑制 L 型钙离子通道、降低细胞内钙离子浓度引起血管平滑肌舒张。D'Souza 等^[3]发现在鼠心灌流液中加入格列苯脲能抑制 BNP 对缺血再灌注损伤的保护作用,提示 ATP 敏感钾离子通道可能参与 BNP 对鼠冠脉的舒张作用。本研究通过观察各种工具药对 BNP 舒张猪冠状动脉血管环的影响,旨在从受体、信号转导通路和离子通道等方面探讨其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 BNP 和 NPR-C 拮抗剂 cANF(4-28)由成都凯捷生物医药科技发展有限公司合成;鸟苷酸环化酶抑制剂 1H-(1,2,4)恶二唑(4,3- α)喹啉啉-1-酮(ODQ)和各种钾离子通道阻滞剂四乙胺(Tetraethylammonium, TEA)、格列苯脲(glibenclamide)、氯化钡(BaCl₂)、4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-

AP)均购于 Sigma 公司;去甲肾上腺素(NE)购自上海和丰制药有限公司;余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 溶液的配制 BNP 和 cANF4-28 实验前用双蒸水配成 10^{-3} mol/L 原液,实验时加入浴液,工作浓度为 10^{-6} mol/L。Krebs 液成分(mmol/L): NaCl 114.0, NaHCO₂ 18, NaH₂PO₄ 1.8, KCl 4.7, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖 11.5, pH 7.4。

1.2.2 离体血管环灌流实验 屠宰场处死猪后,迅速取出心脏,冷冻保存后立即送往实验室。取左前降支近段血管,将游离的冠状动脉放入到预冷、充以 95% O₂ + 5% CO₂ 的混合气体的 Krebs 液中,去除血管上的结缔组织。剪成 2~3 mm 的小血管环,通过不锈钢小钩连于张力传感器(JZ-100 型,上海益联公司),采用 BL-410 型生物机能实验系统(成都泰盟公司)观察血管张力。给血管环 1 g 的前负荷,在充氧的 Krebs 液中平衡至少 60 min 以上,在此过程中,孵育血管环的液体每 15 分钟换 1 次,并使前负荷维持在 0.5 g 以上。加 10 μ mol/L 的 NE 检测标本活性,然后冲洗使血管张力恢复到基线。稳定 30 min 后重复给予 NE,待张力稳定时,给予各种药物进行实验。舒张率(%) = 药物引起的舒张张力变化/NE 致收缩张力变化 $\times 100\%$ 。实验前用细棉签轻擦内皮面数次去除内皮,使用 10 μ mol/L 的乙酰胆碱检验内皮去除情况,内皮完全去除的血管环不舒张或舒张值在 10% 以内。

1.3 统计学处理 所有实验数据均采用 SPSS 18.0 软件包进

表 1 BNP 对猪冠状动脉环的舒张作用和 cANF4-28、ODQ 及各种钾离子通道阻滞剂对其 R_{max} 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

指标	R_{max} (%)						
	基础值	cANF4-28	ODQ	TEA	格列苯脲	BaCl ₂	4-AP
BNP	68.5 ± 11.5	65.7 ± 11.9	12.4 ± 3.3*	28.9 ± 4.6*	34.4 ± 7.9*	58.1 ± 11.7	62.3 ± 12.5

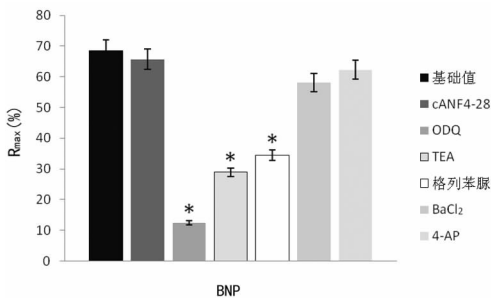
*: $P < 0.05$, 与基础值比较。

行统计。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和两两显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BNP 对猪冠状动脉的舒张作用以及 cANF4-28 或 ODQ 对其舒张作用的影响 10^{-6} mol/L 的 BNP 对血管环产生了明显的舒张效应, 最大舒张率 (R_{max}) 为 (68.5 ± 11.5)% ($n = 10$)。然后预先加入 NPR-C 拮抗剂 cANF4-28 或 GCs 抑制剂 ODQ, 待稳定后再分别加入 BNP, 发现加入 cANF4-28 后脑钠肽的 R_{max} 为 (65.7 ± 11.9)% ($n = 10$), 与加入 cANF4-28 前相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 而加入 ODQ 后脑钠肽的 R_{max} 降为 (12.4 ± 3.3)% ($n = 10$), 与加入 ODQ 前相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 各种钾离子通道阻滞剂对 BNP 舒张猪冠脉血管作用的影响 在溶液中预先分别加入大电导钙离子激活钾离子通道 (large-conductance calcium-activated potassium channels, BKCa) 阻滞剂 TEA (1 mmol/L)、ATP 敏感钾离子通道 (ATP sensitive potassium channel, KATP) 阻滞剂格列苯脲 (10 μ mol/L)、内向整流钾离子通道 (inward rectified potassium channel, KIR) 阻滞剂 BaCl₂ (1 mmol/L) 和电压依赖性钾离子通道 (voltage-dependent potassium channel, KV) 阻滞剂 4-AP (1 mmol/L), 待稳定后再分别加入 10^{-6} mol/L 的 BNP, 发现预先加入 TEA 或格列苯脲均使 BNP 血管舒张作用明显下降 ($P < 0.05$), 而预先加入 BaCl₂ 和 4-AP 对 BNP 血管舒张作用无明显影响 ($P > 0.05$), 见图 1。



*: $P < 0.05$, 与基础值比较。

图 1 BNP 对猪冠脉环的舒张作用和 cANF4-28、ODQ 及各种钾离子通道阻滞剂对 R_{max} 的影响

3 讨 论

BNP 具有舒张血管、利钠、利尿、抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统和抗血管平滑肌细胞及内皮细胞增殖等作用, 其发挥生物学作用主要通过 BNP 受体结合实现。哺乳动物体内有 3 种 BNP 受体即 NPR-A、NPR-B、NPR-C。其中 NPR-A 和 NPR-B 为功能性受体, 与配体结合后与 GCs 耦联, 通过环磷鸟苷 (cGMP)/PKG 途径起作用, 又称为 GC 受体, BNP 优先与 NPR-A 结合; NPR-C 不具有 GCs 胞内结构域, 主要参与配体水解清除, 故称为“清除受体”[1]。新近 Hobbs 等[4] 发现在鼠心灌流液中加入 CNP 或 NPR-C 激动剂 cANF4-23 均能改善

冠脉血流, 减少缺血再灌注损伤, 提示 NPR-C 可能参与 CNP 的舒张血管作用。BNP 是否也能通过 NPR-C 发挥扩血管作用目前尚不清楚。本研究发现, 10^{-6} mol/L 的 BNP 对猪离体冠脉血管环产生了明显的舒张效应, 而加入 NPR-C 拮抗剂 cANF4-28 前后 BNP 的 R_{max} 并无明显变化, 说明 BNP 的舒血管效应可能与 NPR-C 无关。

钾离子通道是决定平滑肌细胞膜电位的重要因素, 钾离子通道开放导致细胞膜超极化, 通过抑制 L 型钙离子通道、降低胞内钙离子浓度引起血管平滑肌舒张。血管平滑肌细胞上主要存在 4 种钾离子通道: 即 KV、KCa、KIR 和 KATP。其中 KCa 根据其电导值的大小又分为大电导、中电导和小电导钙离子激活钾离子通道, 血管平滑肌细胞上的主要是 BKCa[5]。D'Souza 等[3] 发现, 在鼠心灌流液中加入格列苯脲能抑制 BNP 对缺血再灌注损伤的保护作用, 提示 KATP 可能参与 BNP 对鼠冠脉的舒张作用。Otsuka 等[6] 发现, BKCa 阻断剂 IbTx 能降低 BNP 对豚鼠主动脉的舒张作用。本研究预先分别在溶液中加入 4 种钾离子通道的阻滞剂, 待稳定后再分别加入 BNP, 发现预先加入 TEA 或格列苯脲均使 BNP 血管舒张作用明显下降, 而预先加入 BaCl₂ 和 4-AP 对 BNP 血管舒张作用无明显影响, 提示 BKCa 和 KATP 可能参与了 BNP 对猪冠状动脉的舒张作用。

钾离子通道的激活主要与膜电位改变有关, 此外通道蛋白的磷酸化也是激活钾离子通道的一个重要途径。研究表明, BKCa 通道蛋白为四聚体结构, 由形成孔道的 α 亚基及具有调节作用的 β 亚基组成, PKG 可通过磷酸化 β 亚基或 α 、 β 两种亚基开放平滑肌细胞 BKCa, 并增加对 Ca^{2+} 敏感性[7]。KATP 是由 4 个内向整流钾离子通道亚单位 (kir6. x) 和 4 个磺酰脲受体 (sulfonylurea receptor, SUR) 亚单位组成的异源性八聚体结构, 其中 kir6. x 亚单位具有电压门控离子通道和 ATP 抑制点, 而 SUR 亚单位上有若干个 PKG 和 PKA 磷酸化位点, PKG 或 PKA 分别通过磷酸化 SUR 亚单位调节 KATP 的开放或关闭[8]。NPR-A/B 具有 GCs 胞内结构域, 与配体结合后激活 GCs 引起细胞内 cGMP 浓度升高, 通过激活 PKG 磷酸化通道蛋白开放 BKCa 和 KATP。Otsuka 等[6] 在豚鼠主动脉环张力实验中发现 BKCa 阻滞剂 IbTx 能抑制 BNP 或 8-Br-cGMP 诱导的舒血管作用, 本研究预先在溶液中加入 GCs 抑制剂 ODQ 后发现 BNP 的舒血管作用被明显抑制, 说明 GCs 的激活参与了 BNP 的舒血管作用。

参 考 文 献:

- [1] Tsujino M, Hirata Y. Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), C-type natriuretic peptide (CNP)[J]. Nippon Rinsho, 2010, 68: 619-622.
- [2] Villar IC, Panayiotou CM, Sheraz A, et al. Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor[J]. (下转第 531 页)

术是一个简单且有效的鉴定细菌间遗传差异的方法。

本研究首次将 SSH 技术应用于化脓性链球菌毒力株特异基因的研究,以标准菌株作为对比材料,严格检测基因组 DNA 提取质量,基因组 DNA 酶切,接头连接,两轮消减杂交及两次抑制 PCR 等反应步骤,使 Tester 与 Driver 中共有的基因片段得到消减,存在于 Tester 中的特异基因得到特异性扩增。通过 T/A 克隆技术,将两轮扩增 PCR 产物纯化后直接与 T 载体连接,成功构建化脓性链球菌毒力株特异基因文库,并且通过 M13 双向引物测序,与 Genbank 数据库 BLAST 比对得到了 12 个差异基因片段,7 个序列均与已知基因有高度的同源性,包括了链球菌激酶、链球菌补体抑制剂、C5a 肽酶、致热外毒素 C、DNA 促螺旋酶等,有 5 个未检索到同源序列,这些未知的序列有待于进一步的研究,期望对治疗化脓性链球菌感染有所帮助。

参考文献:

- [1] Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci[J]. J Exp Med, 1933,57(4):571-595.
- [2] Holm SE. Invasive group A streptococcal infections[J]. N Engl J Med,1996,335(8):590-591.
- [3] Zhang YL,Ong CT,Leung KY. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish[J]. Microbiology,2000,146(Pt 4):999-1009.
- [4] Strauss EJ,Falkow S. Microbial pathogenesis: genomic and beyond[J]. Science,1997,276(5313):707-712.
- [5] Diatchenko L,Lau YF,Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(12):6025-6030.
- [6] Janke B,Dobrindt U,Hacker J, et al. A suppressive subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli*

k-12 strain MG1655[J]. FEMS Microbial Letters,2001,199(1):61-66

- [7] 田云, Frank M Aarestrup, 陆承平. 猪链球菌 2 型的可能毒力基因的发现[J]. 微生物学报,2004,44(5):613-616.
- [8] Zhou H, Yang B, Xu F, et al. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization[J]. Vet Microbiol, 2010,144(3/4):377-383.
- [9] Bronowski C, Winstanley C. Identification and distribution of accessory genome DNA sequences from an invasive African isolate of *Salmonella Heidelberg*[J]. FEMS Microbiol Lett,2009,298(1):29-36.
- [10] Suzuki N, Seki M, Nakano Y, et al. Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridians group Streptococci by genomic subtractive hybridization[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(9):4528-4234.
- [11] Qiuchun L, Xu Y, Jiao X. Identification of *Salmonella pullorum* genomic sequences using suppression subtractive hybridization[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(9): 898-903.
- [12] Radnedge L, Gamez-Chin S, McCready PM, et al. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*[J]. Appl Environ Microbiol, 2001,67(8):3759-3762.
- [13] Walker JC, Verma NK. Identification of a putative pathogenicity island in *Shigella flexneri* using subtractive hybridization of the *S. flexneri* and *Escherichia coli* genomes [J]. FEMS Microbiol Lett,2002,213(2):257-264.
- [14] Parsons YN, Panagea S, Smart CH, et al. Use of subtractive hybridization to identify a diagnostic probe for a cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol,2002,40(12):4607-4611.

(收稿日期:2011-06-11 修回日期:2011-11-07)

(上接第 528 页)

- Cardiovasc Res,2007,74:767-770.
- [3] D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, et al. B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via KATP channel opening[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003(284):H1592-1600.
- [4] Hobbs A, Foster P, Prescott C, et al. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide[J]. Circulation,2004,110:1231-1235.
- [5] 莫显刚, 罗兴林. 大电导钙激活钾通道与动脉粥样硬化[J]. 基础医学与临床,2008,28:1216-1218.
- [6] Otsuka K, Tanaka H, Horinouchi T, et al. Functional con-

tribution of voltage dependent and Ca^{2+} activated K^+ (BKCa) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides [J]. J Smooth Muscle Res,2002,38:117-129.

- [7] Williams WR. Relative similarity within purine nucleotide and ligand structures operating on nitric oxide synthetase, guanylyl cyclase and potassium (KATP, BKCa) channels [J]. J Pharm Pharmacol,2011,63:95-105.
- [8] Hund TJ, Mohler PJ. Differential roles for SUR subunits in KATP channel membrane targeting and regulation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2011,300:H33-35.

(收稿日期:2011-06-21 修回日期:2011-11-01)