基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0929-03

外力打击兔颈动脉窦压力感受器后血液及组织中 ANP 的变化及意义

李剑波[1]，朱素敏[2]，米 粲[3]

（1. 重庆医科大学基础医学院法医教研室，重庆 400016；2. 重庆市血液中心输血研究所，重庆 400015；
3. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：通过对外力打击兔颈动脉窦压力感受器后血液及组织中心房利钠肽（Atrial natriuretic polypeptide，ANP）变化的研究，探讨其在神经源性休克死亡中的意义。方法：采用放射免疫法检测血浆中 ANP 的变化，采用 RT-PCR 法及凝胶图像分析系统检测组织中 ANP mRNA 基因表达水平。结果：实验死亡组血浆 ANP 含量比实验前升高 3.37 倍，有显著性差异（$P<0.01$）；死亡组与存活组、损伤对照组分别比较，有显著性差异（$P<0.01$）。颈动脉窦压力感受器受外界打击后脑、心肌组织中 ANP mRNA 表达明显增高，尤以脑中表达增加明显。结论：ANP 在神经源性休克死亡过程中起着重要作用。

【关键词】颈动脉窦压力感受器；心房利钠肽；法医学
【中国图书分类法分类号】R89 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-07-05

The alteration and significance of ANP in blood and tissues of rabbits whose CSB were hit by using external mechanical force

LI Jian-bo[1], ZHU Shu-min[2], MI Can[3]

(1. Department of Forensic, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Institute of Blood Transfusion, Chongqing Blood Center; 3. Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the significance of ANP in the death progress of neurogenic shock through the study of its alteration in blood and tissues of rabbits whose CSB were hit by using external mechanical force. *Methods*: ANP was detected by radioimmunological technique in blood serum, and the expression of ANP mRNA was detected by RT-PCR and agarose gel electrophoresis graph analysis system in tissues. *Results*: There was significant difference in blood ANP concentration before and after the experiment ($P<0.01$). ANP was increased 3.37 times in death group. There was obvious difference in blood ANP level between death group, survival group and injury group after experiment ($P<0.01$). There was significant difference in the expression of ANP mRNA in right auricle and brain between before and after experiment ($P<0.05$), especially in brain. *Conclusion*: ANP plays a primary role in the death progress of neurogenic shock.

【Key words】carotid sinus baroreceptor; atrial natriuretic polypeptide; forensic medicine

前期研究中发现，刺激兔颈动脉窦后的主要生理表现是血压下降、心率减慢。临床发现神经源性休克表现为血压下降、心率减慢[1]，刺激颈动脉窦后心房利钠肽（Atrial natriuretic polypeptide，ANP）颗粒减少。ANP 是心脏生产和分泌的一种生物活性多肽激素，可以直接释放到血浆中，具有较强的舒张血管和降低血压作用及较强的利钠利尿作用[2,3]。

本实验拟以血浆 ANP 的含量变化及组织中 ANP 的表达变化，探讨其与颈动脉窦压力刺激后造成动物休克死亡的关系。

作者介绍：李剑波（1962-），男，教授，博士，研究方向：法医学。
通信作者：米 粲，女，教授，Email：micancq@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验分组及取材

1.1.1 实验分组 健康成年兔 28 只，体重（2 000 ± 100）g（由重庆医科大学动物中心提供），随机分为损伤对照组及实验组，实验组 20 只，对照组 8 只。实验组：右后肢股部普鲁卡因局部麻醉，分离股动脉，插管，监测血压及脉搏。分离右侧颈动脉窦，钝性暴力（钢球 40 g，30 cm 高处自由落下），打击右侧颈动脉窦，并保持重物压迫在其上 30 s。损伤对照组：在兔右后肢造成切创损伤模型。

1.1.2 实验取材 抽取股动脉血 5 ml，制备血清。分别提取部分右心房、脑干（延髓）、右肝、右肾上腺、右肾、脾等组织，迅速转移至-80℃冰箱保存。

表 1　兔各组血清浆中 ANP 含量变化（单位 pg/ml）

组别	例数	实验前	实验后	实验前后差值
死亡组	5	195.397 5 ± 13.150 1	657.197 5 ± 185.824 0	461.800 0 ± 189.944 7
存活组	15	169.678 7 ± 28.716 5	173.830 0 ± 20.259 6	4.151 3 ± 15.990 8
对照组	8	157.468 8 ± 31.044 1	167.398 8 ± 55.667 0	9.930 0 ± 38.703 0

注：实验前 ANP 在死亡组、存活组、对照组各组相比较：$P>0.05$；实验后在死亡组与存活组，死亡组与对照组之间相比较：$P<0.01$；存活组与对照组相比较：$P>0.05$；实验前后差值在死亡组与存活组，死亡组与对照组之间相比较：$P<0.01$；存活组与对照组相比较：$P>0.05$

1.2　材料与方法

1.2.1　血中 ANP 含量测定　试剂：^{125}I-ANP、ANP 抗体、ANP 标准品（2 000 pg/ml）：均购自北京科美东雅生物技术有限公司；用缓冲液对倍稀疏，浓度分别为 2 000、1 000、500、250、125、62.5 pg/ml 运用 DFM-97 型 10 管放射免疫 γ 计数器（合肥众成公司），采用平衡法，由自动 γ 计数器预先编制程序，计算有关参数、绘制标准曲线、测定样品浓度。

1.2.2　心肌组织中 ANP mRNA 测定

1.2.2.1　引物合成　兔 ANP（GenBank，GI:164770）引物序列：ANP-F1：5'-tcttctgtctggcattctgg-3'；ANP-RI:5'-ttatcttcggtac-cggaagc-3'；ANP-F2：5'-taacccagtgtacaacgcca-3'；ANP-R2：5'-ttccctggctgttatcttcg-3'。兔 GAPDA（GenBank，GI:62652515）引物序 GAPDH-F:5'-agattgtcagcaacgcatcc-3'；GAPDH-R：5'-gatggaaactgtgaagaggg-3'；以上引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2.2　RNA 提取[4,5]　将 0.2 g 组织加入 4 ml Trizol 液，匀浆；将匀浆转入离心管中，加入 0.4 ml 三氯甲烷，震荡 20 min 后离心（9 000 r/min，15 min，4℃）；去除上清液，加入 75% 乙醇 5 ml 离心（9 000 r/min，5 min，4℃）；去除上清液，留取 1 ml 转入1.5 ml EP管中，离心（14 000 r/min，5 min，4℃）；用 100 μl 加样器去除上清液，放置于冰上，盖上保鲜膜，使其自然挥发干燥（20~30 min）；加入 100 μl TE 缓冲液，振荡混匀后，放入-80℃保存备用；紫外分光光度计测量吸光光度值（Optical density，OD）OD_{260} 和 OD_{280} 值，计算 OD_{260}/OD_{280}，估计 RNA 的浓度与纯度；上样于 1% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭显色，紫外灯观察有无 RNA 及 RNA 降解程度。

1.2.2.3　以总 RNA 为模板逆转录 cDNA　加入反应混合物：模板 RNA 总 RNA 2 μl、引物 1 μl、无 RNA 酶的去离子水 9 μl；混匀后离心；冰浴后，加入 4 μl 5 × Reaction Buffer、1μl RNnase inhibitor（20 U/μl）、2 μl dNTP Mix（10 mmol/L）；混匀后离心；将含反应混合物的 EP 管放入 37℃孵育箱，加入 1 μl M-Mulv 逆转录酶（20 U/μl），终体积为 20 μl；将含反应混合物 EP 管放入 37℃孵育箱 60 min；70℃恒温加热，10 min 后结束反应，置于冰上继续后续实验或冷冻保存。

1.2.2.4　PCR 反应扩增 cDNA　建立反应体系：所有溶液融化后轻轻震荡并短暂离心；在冰上的 PCR 反应管中依次加入以下组分，2 μl 10 × PCR Buffer、1 μl dNTP（2 mmol/L）、1 μl 上游引物（ANP、GAPD）、1 μl 下游引物、0.2 μl Taq DNA 聚合酶、1 μl 模板 cDNA、13.8 μl Sterilized ddH_2O。整个反应体系为 20 μl，震荡混匀并短暂离心，将管壁上的液体收到管底。设置 PCR 反应过程：变性温度 94℃ 1 min、退火温度 64℃ 1 min、延伸温度72℃ 1 min、30个循环，最后72℃延伸10 min，将 PCR 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳 60 min。用凝胶成像分析系统扫入电脑，用 SynGene Gene Tools 软件分析系统软件分析目的带积分灰度值，以明确基因的表达水平。

1.3　数据统计

实验数据采用 SAS8.0 进行统计分析，统计方法组与组之间采用 t 检验和 Wilcoxon 秩和检验。

2　结　果

2.1　动物实验结果

20 例实验动物，有 5 例死亡，表现为在颈动脉窦压力打击 2~5 s 后心率极为缓慢（<10 次/min）或停止，后心率部分恢复，但均未超过 30 次/min；同时伴随有血压逐渐下降，呼吸频率逐渐变慢，节律紊乱，呈叹息样呼吸。

2.2　血中 ANP 含量变化

兔各组血中 ANP 浓度变化如表 1。

2.3　ANP mRNA 表达

正常组、死亡组动物的心脏（右心房）、脑（延髓）均有 ANP mRNA 的表达，但死亡组 ANP mRNA 表达明显增强，其结果见图 1。肝、脾、肾、肾上腺等组织中无 ANP mRNA 的表达。



ANP的 RT-PCR 检测，1. 脑（对照）；2. 脑（实验）；3. 心脏（对照）；4. 心脏（实验）；5. 阴性对照；6. Marcker GADPH 为放量对照

图 1　心、脑组织中 ANP mRNA 表达

用 SynGene Gene Tools 软件对凝胶图像自动分析系统的信号分析，对照组和实验组（死亡组）心脑 ANP mRNA 表达水平见表 2。

表 2　心脑组织中 ANP mRNA 的表达水平

	心	脑
正常组	100	25.05
死亡组	266.22	85.58

（备注：mRNA 未表达的未列图表）

3　讨　论

ANP 的分泌受物理、体液、神经因素等多种因素的影响。当血压升高时，颈动脉窦压力感受器发放冲动传入中枢，一方面使迷走神经活动加强，另一方面使交感神经紧张性抑制减弱，表现为心率减慢，心脏活动减弱，血压下降。理论上认为，刺激颈动脉窦压力感受器后迷走神经兴奋与交感神经抑

制使 ANP 释放降低，但实验中观察到，颈动脉窦压力感受器受外界压力刺激后，心率减慢或停止，而血浆 ANP 均较实验前升高（$P<0.05$），尤以死亡组动物明显（$P<0.01$）。

实验结果表明，实验前（死亡组、存活组）、损伤对照组血浆 ANP 比较组间无显著性差异（$P>0.05$）。实验存活组与损伤组，血浆 ANP 均有轻度升高，两组间比较无显著性差异（$P>0.05$）。而实验死亡组血浆 ANP 在实验前后，实验死亡组与存活组、损伤对照组比较，各组间 $P<0.01$，有显著性差异。

血浆中 ANP 含量升高的原因及机制：损伤对照组血浆中 ANP 含量轻度升高，可能是机体的应激反应，儿茶酚胺类激素促使 ANP 分泌。

颈动脉窦外界刺激在存活组兔血浆中 ANP 含量轻度升高的机制可能为：

压力冲击刺激神经末梢，使迷走神经兴奋性增高，交感神经紧张性抑制，生理效应是心率减慢，心输出量下降，外周阻力下降，从而使血压、心率下降。在正常情况下，颈动脉窦压力感受器调节，压力感受器外膜发放冲动减少，血压稳定或轻度升高；交感神经兴奋与血压升高，促使 ANP 释放。故存活组血浆中 ANP 轻度升高的原因可能系继发于交感神经兴奋、血压增高促使 ANP 释放、分泌。

颈动脉窦受外界压力刺激死亡组血浆中 ANP 升高的原因：系颈动脉窦压力感受器损伤引起 ANP 过度释放的后果，其原因可能有：

（1）颈动脉窦压力感受器外膜神经纤维的损伤。

（2）颈动脉窦压力感受器损伤后引起 ANP 过度释放：压力感受器（颈动脉窦外膜神经末梢）损伤破坏，神经冲动发放明显减少或甚至消失，使迷走神经兴奋性减弱，而交感神经兴奋性明显增强，而促使 ANP 释放。同时交感神经兴奋增高，释放儿茶酚胺类激素，一方面儿茶酚胺类激素直接促进释放 ANP；另一方面儿茶酚胺类激素可引起心肌损伤，心肌损伤后引起心功能不全，心功能不全又引起 ANP 过度释放。

（3）ANP 的过度释放可引起血管舒张、血压下降，又进一步加重心肌缺血改变。儿茶酚胺类激素引起心肌损伤，及 ANP 过度释放引起的血管舒张、血压下降引起的心肌损伤，两者更进一步加重心肌缺血性损伤而引起急性心力衰竭，心力衰竭又进一步促使 ANP 释放。故血浆 ANP 明显升高。

ANP mRNA 的表达的变化及意义：形态学观察到死亡组心肌内 ANP 颗粒大量释放，血浆中 ANP 含量明显上升，说明心肌内 ANP 释放到血浆中而发挥其舒张血管、降低血压等生物学效应。本实验部分观察到正常对照组心、脑组织中均有 ANP mRNA 的表达，而且心肌内 ANP 含量较脑内高 3.99 倍。而死亡组与正常组比较，ANP mRNA 表达明显升高。心肌内较正常组升高 2.66 倍，脑内较正常组升高 3.42 倍，脑内 ANP mRNA 表达幅度高于心脏内 ANP mRNA 幅度。ANP 通过自分泌、旁分泌和内分泌作用与 G 蛋白受体结合，使细胞内 cGMP 浓度升高，因此具有促进水钠排除，使局部和非 ANP 产生器官的血管舒张。以往学者研究表明[6,7]，应激刺激和吗啡可引起 ANP mRNA 表达增强。结合前面实验，说明颈动脉窦压力感受器受外界压力刺激后引起 ANP 大量释放到血浆中，同时也刺激心脏细胞中基因水平 ANP 合成增加。而脑内 ANP mRNA 增高，一方面是心脏大量释放 ANP，产生刺激信号，促进 ANP 在基因水平的合成，另一方面，可能系颈动脉窦压力感受器刺激后直接刺激脑内 mRNA 的合成，故脑内 mRNA 合成增加较心脏明显，说明压力感受器被打击后中枢神经系统也参与 ANP 的分泌、合成，在降低血压的生物学效应过程中起到重要作用。实验观察到，在颈动脉窦外界压力刺激后动物在 30 min 死亡，心肌内 ANP 颗粒释放，血浆 ANP 含量增高，ANP mRNA 表达增强，提示 ANP mRNA 可作为一种降低血压应激反应指标。

颈动脉窦受外界压力刺激后死亡机制：28 例动物解剖及组织学检查未发现有致死性基础疾病存在，实验组 5 例死亡动物的死亡原因均与颈动脉窦受外界压力刺激有关。5 例死亡动物在颈动脉窦受外界压力刺激后血浆中 ANP 含量较实验前明显增高（2~4 倍，>500 pg/ml），并与实验存活组、损伤对照组比较有显著性差异（$P<0.01$），故其死亡与血浆 ANP 含量增高有关，其机制可能为：颈动脉窦压力感受器（外膜神经末梢）受损，儿茶酚胺分泌使心肌损害，并促使 ANP 过度释放，而 ANP 血浆水平增高，使血管明显舒张、血压下降，进一步导致急性心肌缺血损害，引起急性心力衰竭死亡。颈动脉窦受外界压力刺激后可引起迷走神经兴奋，交感神经抑制使心率减慢或停止，随着应激反应或 CSR 再调节受损致交感神经兴奋，释放大量儿茶酚胺，儿茶酚胺类激素一方面引起心肌损害，另一方面促使心肌过度分泌释放 ANP，使外周血管扩张，血压下降，而血压下降进一步引起心肌缺血改变，进一步促进 ANP 释放，导致心力衰竭死亡。

4 结 论

颈动脉窦受外界压力刺激可引起 ANP 释放；外界压力打击引起颈动脉窦压力感受器损伤后 ANP 过度分泌释放、血管扩张、血压下降、心肌缺血导致动物急性心力衰竭死亡；血浆 ANP 升高可作为压迫颈动脉窦导致的死亡诊断指标之一，但需与其它原因引起的心力衰竭的疾病鉴别。颈动脉窦压力感受器受外界压力刺激后可引起心、脑组织中 ANP mRNA 表达升高。脑表达升高幅度较明显，说明中枢神经系统也参与 ANP 分泌、合成。

参 考 文 献

[1] Guly H R, Bouamra O, Lecky F E. Trauma audit and research network. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department[J]. Resuscitation, 2008, 76(1): 57-62.

[2] 汤 健，费 红. 心脏的内分泌功能及其临床意义[J]. 中华内科杂志，1984，23(3)：721-724.

[3] 汤 健，唐朝框，主编. 循环系统的内分泌功能[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1989.2-5，5-6，10-11，13.

[4] 姜 泊，张亚历，周殿元，主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京：人民军医出版社，1996.56-63.

[5] 黄培堂，译. 分子克隆实验指南（第三版）[M]. 北京：科学出版社，2002.518-588.

[6] Suttner S W, Boldt J. Natriuretic peptide system: physiology and clinical utility[J]. Curr Opin Crit Care, 2004, 10(5): 336-341.

[7] 张家颖，闫晓凯. 持续高应激状态对心脏心钠素基因表达影响的研究[J]. 白求恩医科大学学报，1999，25(5)：574-576.

（责任编辑：关蕴良）