DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.02.003

缺氧对幼猪肺组织和肺小动脉壁钙调蛋白活性量的影响

喻明美 孙秉膺 王仕军 (病理生理学教研室 高原医学研究室)

提 要 作者观察了慢性缺氧对幼猪肺组织和肺小动脉壁钙调蛋白活性量的影响。缺氧动物的上述组织均在缺氧条件下取出。结果表明:①慢性间断性低压缺氧的幼猪在4000m模拟高原肺动脉增压反应明显。②缺氧动物肺组织钙调蛋白活性量较平原组显著增高。③在肺小动脉持续收缩时,取材测得肺小动脉壁钙调蛋白活性量与平原组相比无显著改变。说明缺氧性肺小动脉收缩不是通过影响平滑肌细胞内钙调蛋白活性量而实现的。

关键词 缺氧症; 高血压,肺性; 钙调素; 肺; 小动脉,肺内

近年的研究表明,Ca^{2+} 在缺氧性肺动脉高压的发生中起重要作用[1][2][3]。钙调蛋白(calmodulin, CaM)是 Ca^{2+} 的细胞内受体,Ca^{2+} 通过与CaM结合而引起血管平滑肌收缩[4]。因此,缺氧时肺小动脉壁的CaM活性量有无改变及其与肺动脉高压的关系值得探讨。蔡英年等观察到缺氧大鼠肺组织CaM活性量降低[5]。但肺组织的CaM活性量不能代表缺氧时肺血管收缩的发生部位—肺小动脉壁内的情况。陈江帆观察到缺氧家兔在缺氧条件下取材,肺小动脉和肺组织CaM活性量与平原对照组无显著差异[6]。但家兔的缺氧性肺动脉增压反应较弱。国外有关的研究报道尚未见及。猪的肺循环在结构上与机能上与人的颇为相似,而且缺氧时肺动脉增压反应明显[7]。本文作者观察了慢性间断性低压缺氧对幼猪肺组织、肺小动脉壁的CaM活性量的影响。慢性缺氧动物的组织标本均在缺氧条件下取出,可以更准确地反映缺氧时组织CaM活性量改变的情况。

材料与方法

长白种幼猪,2～4月龄,雌性,随机分为2组:

1. 平原对照组 幼猪9只,体重11.1～14.1kg。用戊巴比妥钠腹腔麻醉(30～40mg/kg体重)。经右侧颈外静脉将漂浮式热敏心导管(5F, Electro-Catheter Corporation, USA)插至肺动脉,插一塑料管入左侧颈总动脉。待肺动脉压稳定后,测定心率(HR)、肺动脉压(Ppa)、心输出量(CO)、颈总动脉压(Psa),取动脉血做血气分析。然后经颈总动脉放血,在动物死亡前打开胸腔,取出左肺下叶组织约2g。自左肺下叶分离肺小动脉(外径0.04～0.7mm)组织约0.3g,置0～4℃保存,用于CaM活性量的测定。

2. 慢性缺氧组 幼猪10只,在低压舱内缺氧(4000m模拟高原,每天8h,共21天)。第22天进行实验,此时动物体重11.6～14.8kg。麻醉及操作同平原组。待肺动脉压稳定后测定各项指标。在低压舱内达到4000m模拟高原后,立即测值。在4000m停留第60min末再测值1次。然后在4000m模拟高原经动脉放血,开胸取出所需组织,用于测定。

Ppa和Psa用连于life Scope-8(OFC-3200, Nihon Kohden, Japan)的TP101T压力换能器测定。CO以热稀释法,用心输出量测定仪(MLC-4200, Nihon Kohden, Japan)测定。动脉血pH、PaO_2、$PaCO_2$用血气分析仪(ABL$_3$, Radiometer, Copenhagen, Denmark)测定。

肺血管阻力(PVR)、总外周阻力(TPR)用以下公式计算:

$$PVR(kPa/L/min)=\frac{Ppa(kPa)}{CO(L/min)}$$

$$TPR(kPa/L/min)=\frac{Psa(kPa)}{CO(L/min)}$$

CaM活性量采用磷酸二酯酶法,按刘景生报道的方法测定[8],以μg/mg蛋白表示。组织蛋白含量用Lowry法测定[9]。

实验数据用计算机进行单因素方差分析,各项结果以$\bar{X}\pm SE$表示。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结　　果

一、缺氧对血流动力学指标、血液气体参数等的影响

平原组的Ppa、PVR、Psa、TPR与缺氧组在平原的相应值无显著差异。缺氧组动物在4000m模拟高原Ppa、PVR和TPR均较平原值显著增高。Psa亦增高，但与平原值差异不显著。平原组HR和CO与缺氧组的平原相应值无显著差异。缺氧时各时点HR和CO亦无显著差异(表1)。

表1　模拟4000m高原对慢性间断缺氧幼猪血流动力学指标的影响($\bar{X}\pm SE$)

	平原组	缺氧组		
		平原值	4000m即刻	4000m 60min末
Ppa(kPa)	2.8±0.3 (n=9)	3.3±0.4 (n=7)	6.1±0.4* (n=7)	5.3±0.4* (n=7)
PVR(kPa/L/min)	1.0±0.1 (n=8)	1.3±0.1 (n=8)	2.7±0.3* (n=7)	2.2±0.1* (n=7)
Psa(kPa)	14.2±0.7 (n=8)	14.7±0.7 (n=8)	17.3±1.2 (n=7)	17.4±1.3 (n=7)
TPR(kPa/L/min)	6.1±0.7 (n=8)	5.9±0.4 (n=8)	8.4±0.8* (n=7)	7.5±0.8* (n=7)
HR(beats/min)	169±10 (n=7)	151±18 (n=8)	166±13 (n=7)	143±9 (n=7)
CO(L/min)	2.6±0.3 (n=8)	2.5±0.1 (n=8)	2.1±0.2 (n=7)	2.4±0.2 (n=7)

注：* 表示与本组平原值比较有显著差异。平原组各指标与缺氧组相应指标的平原值比较均无显著差异。

慢性缺氧组幼猪在4000m模拟高原PaO_2显著低于其平原值，$PaCO_2$和pH无显著变化(表2)。

表2　模拟4000m高原对慢性间断缺氧幼猪血液气体参数及pH值的影响($\bar{X}\pm SE$)

	平原值	4000m即刻	4000m60min末
PaO_2(kPa)	10.9±0.5	6.3±0.9*	5.5±1.1*
$PaCO_2$(kPa)	5.5±0.3	4.8±0.4	4.5±0.5
pH	7.372±0.001	7.423±0.003	7.464±0.002

注：*表示与平原值比较有显著差异。

二、缺氧对幼猪组织CaM活性量的影响

缺氧组肺组织CaM活性量显著高于平原组，肺小动脉壁CaM活性量在两组间无显著差异(表3)

表3　缺氧对组织CaM活性量的影响
($\bar{X}\pm SE$, $\mu g/mg$蛋白)

	平原组	缺氧组	P
肺组织	1.431±0.183 (n=8)	2.208±0.224 (n=8)	<0.01
肺小动脉壁	5.420±0.926 (n=7)	4.773±0.788 (n=7)	>0.05

讨　　论

CaM是1种细胞内广泛存在的蛋白质，可与Ca^{2+}形成复合物从而调节细胞内的一些生理过程，如血管收缩、细胞分泌等[10][11]。它也可能参与某些病理过程的发生和发展。

在本实验中，缺氧幼猪肺组织的CaM活性量显著高于平原组。Ca^{2+}和CaM可激活许多内分泌细胞和外分泌细胞的微管蛋白激酶从而调节其分泌活动，CaM还可激活磷酯酶A_2而使前列腺素分泌增加[10]。已知缺氧能使肺脏某些非肌性细胞释放化学物质（如组织胺、前列腺素等）增多。因此，缺氧动物肺组织CaM活性量增高可能与肺脏某些非肌性细胞内CaM活性量增高并释放血管活性物质增多有关。这些血管活性物质增加可使肺动脉收缩加强，促使缺氧性肺动增高压发生。

Ca^{2+}、CaM系统对血管平滑肌张力的调节是通过肌球蛋白轻链磷酸化而实现的[4]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有关CaM与缺氧性肺血管收缩关系的研究刚刚开始，报道很少。蔡英年等发现低压缺氧可致对缺氧敏感性高的大鼠(Hilltop SD)和对缺氧敏感性低的大鼠(Wistar)肺组织CaM活性量降低。她认为缺氧使Ca^{2+}跨膜内流增多，细胞外[Ca^{2+}]降低，对CaM刺激减弱，故肺组织CaM活性量降低[5]。陈江帆观察到低压缺氧10～11天的家兔，在缺氧状况下取材测得肺小动脉壁和肺组织的CaM活性量均无显著变化[6]。本实验证明，慢性缺氧对幼猪肺小动脉壁CaM活性量无显著影响，与陈江帆所得的结果一致。这提示缺氧性肺小血管收缩不是通过影响CaM活性量而实现的。有人将卵泡刺激素注入未成熟的或切除垂体的大鼠或加到含滋养叶细胞的培养基中，发现虽然卵泡刺激素促进滋养叶细胞中依赖于CaM的RNA和蛋白质合成，但CaM含量不变[11]。Means认为以上结果提示CaM所介导的酶的调节是通过Ca^{2+}净流量和Ca^{2+}分布的改变，而不是通过细胞内CaM含量的改变而实现的[11]。在正常状态下，血管平滑肌细胞内可能含有较多的CaM，但由于[Ca^{2+}]较低，CaM活性未能充分发挥。缺氧使细胞内[Ca^{2+}]增高，充分激活细胞内原有的CaM而使血管平滑肌收缩加强。缺氧性肺血管收缩还可能是通过CaM以外的其它途径(如平滑肌张力素系统)而实现的。

参 考 文 献

1. Haack DW, et al. Effects of hypoxia on the distribution of calcium in arterial smooth muscle cells of rats and swine. Cell Tissue Res. 1975; 157: 125 ～ 140
2. Stanbrook HS, et al. Prevention and reversal of hypoxic pulmonary hypertension by calcium antagonists. Am Rev Respir Dis. 1984; 130(1): 81 ～ 85
3. 孙秉庸，等. 缺氧性肺动脉和体动脉增压反应的研究——慢性间断缺氧的影响及其机制. 病理生理学报. 1985; 1(2): 8 ～ 12
4. Hartshorne DJ. Regulatory mechanisms in smooth muscle: the role of myosin phosphorylation. In: Smooth muscle contraction. Stephens NL ed., Marcel Dekker Inc., New York and Basel. 1984: 271 ～ 282
5. 蔡英年，等. 慢性缺氧对大鼠肺动脉 $^{45}Ca^{2+}$ 跨膜内流和肺组织钙调蛋白含量的影响. 科学通报. 1987; 32(5): 380 ～ 382
6. 陈江帆，等. 缺氧家兔组织钙调蛋白水平及钙调蛋白拮抗剂对血流动力学的影响. 第二军医大学学报. 1987; 9(1): 21 ～ 25
7. Rendas A, et al. Growth of pulmonary circulation in normal pig: structural analysis and cardiopulmonary function. J Appl Physiol. 1978; 45(5): 806
8. 刘景生. 钙调素的制备及活性测定. 中国医学科学院学报. 1985; 27(6): 453 ～ 458
9. Lowry OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265 ～ 275
10. Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science. 1980; 207(4426): 19 ～ 27
11. Means AR, et al. Calmodulin- an intracellular calcium receptor. Nature. 1980; 285(5760): 73 ～ 77

(收稿：1988.11.2; 修回：1989.2.10)

Effects of Hypoxia on Calmodulin Levels of Lung Tissue and Intrapulmonary Arteriolar Wall in Young Pigs

Yu Mingfu, et al
(*Department of Pathophysiology and Institute of High Altitude Medicine, Third Military Medical College*)

The effects of chronic hypoxia on calmodulin levels of lung tissue and intrapulmonary arteriolar wall in young pigs were studied. The specimens of hypoxic animals were taken under hypoxic condition from the hypoxic animals. It was observed that (1) the swine exposed to chronic intermittent hypobaric hypoxia showed significant pulmonary pressor response at 4000m simulated high altitude, (2) the calmodulin level of lung was higher in hypoxic group than in sea level one, while that of intrapulmonary arteriolar wall exhibited no significant difference between hypoxic and control groups. The latter finding suggests that hypoxic pulmonary arteriolar constriction may not be associated with an obvious change of calmodulin level in vascular smooth muscle.

Key words: Anoxia/ES; Hypertension, pulmonary; Calmodulin; Lung/AN; Arterioles, intrapulmonary/AN

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net