DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.01.006



# 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

陈江帆 孙秉庸 王仕军 彭鹰（病理生理教研室 高原医学研究室）

**提 要** 为观察钙调蛋白（CaM）在缺氧所致的肺动脉高压等血流动力学改变中的作用，我们采用环核苷酸磷酸二脂酶的方法测定了缺氧家兔肺动脉、肺和心肌组织CaM水平，观察了脂质体包裹的CaM拮抗剂三氟啦嗪（TFP）对缺氧动物血流动力学的影响。结果表明：1. 缺氧（模拟4000m高原10～11天）家兔肺动脉、肺和心肌组织CaM活性量水平与平原对照值无显著差异，CaM在上述实验条件下改变不甚显著；2. 在模拟4000m高原为缺氧家兔注入脂质体包裹的TFP后，Ppa无显著改变，PVR有增高趋势，而观察45分钟末动物肺动脉的CaM活性受到显著抑制，说明缺氧性肺动脉压增高不一定依赖于CaM；3. 家兔肺循环和体循环对缺氧反应不同，在模拟4000m高原，脂质体包裹的TFP对缺氧动物的肺、体循环的血流动力学影响也不同，提示：肺循环与体循环血管平滑肌收缩的调节机制不尽一致。

**关键词** 缺氧；血流动力学；钙调蛋白；钙调蛋白拮抗剂；三氟啦嗪

高原缺氧、慢性阻塞性肺疾患等引起的肺泡性缺氧可导致肺动脉压增高等血流动力学改变，其确切机制尚未彻底阐明。应用钙拮抗剂的实验结果表明：缺氧时血管平滑肌细胞外的$Ca^{++}$跨膜内流增加可能是缺氧性肺动脉和体动脉增压反应发生的重要环节[1][3]。但有关$Ca^{++}$进入细胞后的具体作用机制有待探讨。

钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是细胞内$Ca^{++}$的受体，$Ca^{++}$对细胞一些功能的调节有赖于CaM的传递[4]。血管平滑肌细胞收缩有CaM或(和)平滑肌张力素的(双重)调节[5][12]。在缺氧过程中，心、肺及血管组织CaM含量有无变化；CaM拮抗剂三氟啦嗪（Trifluperazine, TFP)对缺氧动物的血流动力学有何影响等均未见报道。

本实验选用家兔1. 测定缺氧（模拟4000m高原10～11天）动物肺动脉、肺和心肌组织CaM活性量的水平；2. 观察脂质体(liposome)包裹的TFP对缺氧动物血流动力学的影响；以探讨缺氧动物血流动力学变化的机制。

## 材料与方法

### 一、动物分组与实验步骤

健康杂种白毛家兔29只，雌雄不拘，体重1.8～2.5kg，随机分为三组。Ⅰ组(平原组，n=10)：在戊巴比妥钠麻醉下行股动、静脉插管，并开胸行肺动脉插管，在主动脉上安置电磁血流量计探头。术后在平原每15分钟观测肺动脉平均压（Ppa）、股动脉平均压(Pfa)和心输出量(CO)各一次，历时60分钟。Ⅱ组（缺氧组，n=10）和Ⅲ组（TFP组，n=9）：先将动物置低压舱减压至模拟4000±500m高原，23小时/天，持续10～11天。第11或12天也行上述手术。术后，两组动物在平原稳定15分钟，测上述指标后“上升”至模拟4000m高原，此后Ⅱ组动物在模拟4000m高原每15分钟测指标一次，历时60分钟。Ⅲ组动物在模拟4000m高原稳定15分钟，测值后，以1ml/min的速度向股静脉注入脂质体包裹的TFP（50mM）5ml，于开始注药后的0.5，1，3，5，10，15，30和45分钟末重复测各项指标。用连卜生理记录仪（OEC 3200 Nihon kohden）的压力换能器（Statham P50, Oxnard California)测定肺动脉和股动脉压，用电磁血流量计(MFV 1200 Nihon kohden)测定心输出量，并计算肺血管阻力（PVR）和体循环阻力（SVR）。

全部动物于实验结束后在相应实验高度放血活杀，分离出直径为0.1～1mm的肺动脉组织、肺组织（不含直径>0.1mm的肺动脉）和心肌组织，立即置液氮中保存。

### 二、钙调蛋白活性测定

1.参照Wallace方法[7]，取新鲜猪大脑制成匀浆，20,000×g离心45分钟，取上清液上DEAE纤维

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

素柱，用0.00～0.50M NaCl梯度洗脱。收集高比活力部份浓缩，透析，得到相对纯的，依赖于CaM的磷酸二脂酶(PDE)。此酶最大激活水解率>100 nmol/min/mg prot，激活活性/基础活性≈4～10。

2.取肺动脉、肺和心肌组织制成匀浆，20,000×g离心60分钟，上清液在92℃水浴中热处理4.5分钟，冷却后再次离心即得CaM组织粗提液。

3.采用Wallace改良法[7]测定CaM活性。分二步：$cAMP \xrightarrow{PDE} 5'\text{-}AMP \xrightarrow{蛇毒}$ 腺苷+Pi。$^3$H-腺苷用液体闪烁计数器（Rack-Beta 1217 automatic, Finland Wallace）测定。未反应的cAMP用717阴离子交换树脂除去，腺苷可为717阴离子交换树脂非特异吸附，回收率为61%。根据下式计算PDE活性：

$$\text{活性}\left(\frac{\text{cAMP nmol}}{\text{min/mg prot}}\right) = \frac{\text{实验管DPM值}-\text{空白管DPM值}}{\text{总计数管DPM值}-\text{空白管DPM值}} \times 200 \times \text{mg}^{-1}\text{prot} \div 0.61$$

用双缩脲法测定PDE和组织粗提液的蛋白含量。

4.为使计算标准化，根据CaM标准反应曲线的S形特性，采用本校数学教研室编制的“LOGT”程序，对双变量实测数据进行logistic曲线拟合，根据拟合方程 $y=\frac{1}{1+e^{a-bx}}$，编制程序计算得组织CaM活性量。

### 三、包裹TFP的脂质体的制备

参照Conner反向蒸发法(REV)[8]，取卵磷脂：胆固醇：硬脂酰酰胺（7∶2∶1）2.6ml，加入乙醚和TFP（50mM）5ml混匀，超声后减压蒸发，对磷酸缓冲液透析得到包裹TFP的脂质体。包裹率为40～50%，电镜观察可见直径为0.1～1μ的脂质体。

实验数据均用Apple-Ⅱ计算机进行统计学处理，结果以$\bar{X}\pm SE$表示。

## 结　果

### 一、缺氧对家兔血流动力学、组织钙调蛋白活性量的影响

1.Ⅱ组动物经缺氧（模拟4000m高原）10～11天，在模拟4000m高原，其Ppa和PVR的各时点总均值分别为：31.06±0.54mmHg和105.0±3.4mmHg/L/min，非常显著地高于平原对照组的相应值（$P<0.01$）。Pfa和SVR分别为72.37±1.98mmHg和243.7±6.4mmHg/L/min。非常显著地低于平原对照组的相应值（$P<0.01$）。CO各时点总均值为290.2±6.27ml/min，非常显著地高于平原对照组的相应值（$P<0.01$）。

2.Ⅱ组动物经缺氧（模拟4000m高原）10～11天后，在模拟4000m高原观测1小时，放血处死，分离肺动脉、肺和心肌组织，测定其组织CaM活性量，结果如表1。与平原对照组比较，缺氧组动物的肺动脉和心肌组织CaM活性为低，肺组织CaM为高，但其差异在统计学上均无显著意义($P>0.05$)。

### 二、在模拟4000m高原注入脂质体包裹的TFP对缺氧动物血流动力学和组织CaM活性的影响

1.Ⅲ组动物在模拟4000m高原注入脂质体包裹的TFP后，Ppa在观察期间基本稳定在26.0～31.0mmHg间，与注药前相比无显

表1　缺氧家兔组织CaM活性量水平（μg/mg组织粗提液）

| | 肺动脉 | 肺 | 心肌 |
|---|---|---|---|
| 平原对照组 | 0.129±0.017 (n=7) | 0.143±0.019 (n=6) | 0.099±0.013 (n=6) |
| 缺氧组 | 0.104±0.014 (n=10) | 0.156±0.021 (n=8) | 0.077±0.010 (n=8) |
| P　值 | >0.05 | >0.05 | >0.05 |

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

著差异（P＞0.05）。PVR 在开始注药后即出现上升趋势并持续至观察45分钟末。但与注药前相比无显著差异（P＞0.05）。Pfa在注药后30秒即显著下降，至3分钟末，从注药前的76.63±2.56mmHg降为54.29±2.61 mmHg，此后有回升，但至观察45分钟末，各时点值比注药前有显著下降（P＜0.01）。SVR注药前为300.5±28.9mmHg/L/min,注药后5分钟末降为248.3±17.3mmHg/L/min,此后有回升，并持续至观察45分钟末，但各时点值与注药前无显著差异(P＞0.05)。CO于注药后即有下降趋势，至3分钟末下降显著并持续至观察45分钟末(P＜0.05)。随着CO下降，Pfa进一步下降，PVR增加（图1、表2）。

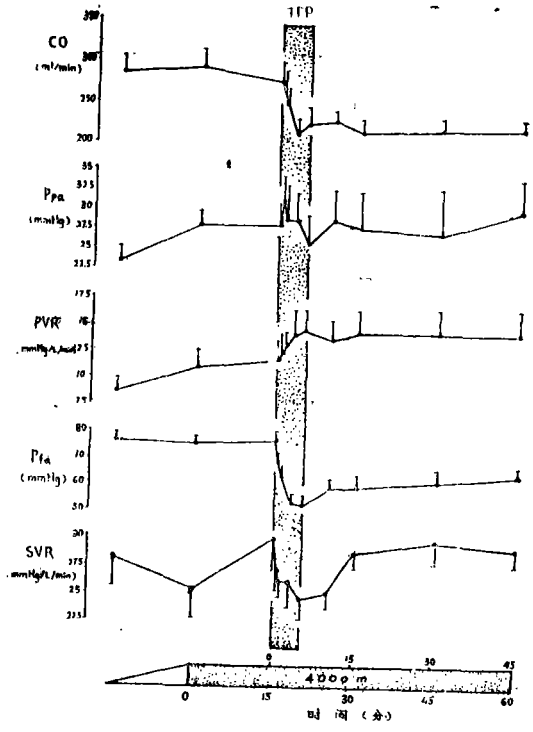



图1　脂质体包裹的TFP对缺氧家兔血流动力学的影响

**2.** 在模拟4000m高原为缺氧动物注入脂质体包裹的TFP后观察45分钟末放血处死，分离肺动脉、肺和心肌组织，测定其CaM活性。CaM活性受到显著抑制。CaM激活反应曲线不呈S型，PDE最大激活水解率下降，激活活性/基础活性＜2.5（图2）。

表2　脂质包裹的TFP对缺氧家兔血流动力学的影响

| | 0m | 4000m | | 4000m+TFP | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 时间 (mim) | 0 | 0 | 15 | 0.5 | 1 | 3 | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 |
| Ppa (mmHg) | 23.66 ±1.62 | 28.67 ±1.62 | 28.37 ±2.15 | 31.25 ±2.68 | 29.67 ±3.51 | 29.43 ±3.10 | 26.78 ±2.80 | 29.25 ±2.91 | 28.56 ±3.00 | 27.89 ±3.43 | 30.88 ±2.73 |
| PVR (mmHg/L/min) | 88.7 ±11.1 | 108.6 ±14.4 | 118.1 ±16.9 | 125.5 ±16.4 | 131.3 ±10.0 | 142.0 ±22.6 | 146.0 ±19.9 | 133.6 ±16.8 | 140.4 ±19.2 | 141.1 ±19.7 | 141.6 ±17.8 |
| Pfa (mmHg) | 76.11 ±2.66 | 75.89 ±2.48 | 76.63 ±2.56 | 68.25* ±2.85 | 63.11* ±3.21 | 54.29* ±2.61 | 52.11* ±3.18 | 58.75* ±3.03 | 59.56* ±4.18 | 61.33* ±4.74 | 64.50* ±2.52 |
| SVR (mmHg/L/min) | 280.9 ±24.1 | 255.0 ±26.3 | 300.5 ±28.9 | 272.8 ±23.2 | 262.0 ±15.1 | 264.5 ±27.2 | 248.3 ±17.3 | 251.1 ±12.8 | 287.6 ±14.8 | 300.5 ±19.6 | 292.8 ±13.6 |
| CO (ml/min) | 286.2 ±21.6 | 288.7 ±23.5 | 279.6 ±27.7 | 269.0 ±26.2 | 255.7 ±16.6 | 212.7* ±18.6 | 227.1* ±24.5 | 231.9* ±14.6 | 217.7* ±16.0 | 223.3* ±15.5 | 226.1* ±13.2 |

* 与注药前相比有显著差异（P＜0.05）

## 讨　论

血管平滑肌收缩调节的特征是：不存在肌钙蛋白对肌动蛋白的抑制和去抑制过程。Hartshorne(1982)提出血管平滑肌收缩调节的肌球蛋白磷酸化学说，认为：血管平滑肌兴奋收缩偶联是通过依赖于Ca++的CaM激活肌球蛋白轻链激酶(MLCK)而使肌球蛋白轻链（MLC）磷酸化，进而激活肌动球蛋白的ATPase而实现的。也有人认为或是通过平滑肌细胞内存在的平滑肌张力素（leiotonin）直接激活肌动球蛋白ATPase所完成。故血

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

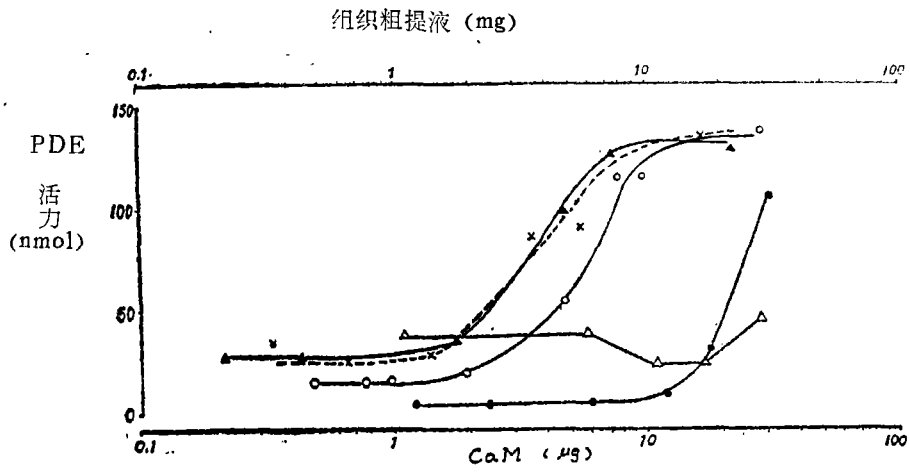



图2　CaM激活反应曲线

○——○ CaM　　●——● Ⅰ组—心肌

▲——▲ Ⅰ组—肺动脉　　△——△ Ⅱ组—肺动脉

×——× Ⅰ组—肺组织

管平滑肌细胞收缩有CaM或（和）平滑肌张力素的（双重）调节。$Ca^{++}$－CaM是血管平滑肌收缩调节的最终共同机制之一。

应用钙拮抗剂的实验结果表明：缺氧时血管平滑肌细胞外的$Ca^{++}$跨膜内流增加可能是缺氧时肺动脉和体动脉增压反应发生的重要环节。但有关$Ca^{++}$进入细胞后的具体作用机制有待探讨，作为$Ca^{++}$的细胞内受体的CaM在缺氧动物血流动力学变化中的作用还未见报道。

1．缺氧家兔组织CaM水平

从本实验结果看，与对照组相比，缺氧家兔的肺动脉和心肌组织CaM活性量为低，肺组织为高，但其差异在统计学上均无显著性意义。这可能在一定程度上反映上述三种家兔组织在模拟4000m高原缺氧10～11天的实验条件下CaM活性量改变不甚显著。在本实验中采用PDE为模板反应体系，所测值为组织CaM活性量。所得结果不排除以下可能性：即单位组织中CaM总量的增加可以弥补CaM活性量的下降。有人观察到自发性高血压大鼠的脑、心脏、主动脉和肾组织CaM总量（放射免疫法）较对照组Wistar－Kyoto大鼠显著为低。也有人在肾性高血压大鼠的主动脉和肾组织中采用环核苷酸磷酸二脂酶方法测定组织CaM活性量较对照组显著增高。Means等[4]根据CaM对激素调节的实验结果则认为：依赖于CaM的酶活性调节关键在细胞$Ca^{++}$的净流量(net flux)和$Ca^{++}$分布的改变，而不在细胞内CaM活性量的改变。但缺氧对CaM活性量影响如何缺乏可资参考的文献。

2．钙调蛋白拮抗剂对缺氧动物血流动力学和组织CaM活性的影响。

TFP是一CaM拮抗剂，广泛用作研究CaM的工具[10]。荧光波谱和核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance)的研究表明TFP和CaM间可通过疏水作用，以离子键形式结合，抑制靶酶的活性。然而TFP结构的疏水特性决定了它除抑制CaM外，还可作用于$\alpha_1$受体、多巴胺受体的位点，抑制细胞膜$Na^+-K^+-ATPase$，阻断去甲肾上腺素摄取等。因此，TFP对整体动物的血流动力学效应比较复杂。有人在离体灌注的肺动脉、肾动脉及主动脉条和冠状动脉条观察到TFP可抑制到平滑肌收缩。但其结果均系得自离体实验，在实验中既未排除TFP对$\alpha_1$受体阻断等所致的血流动力学影响，而且又未同时

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

测定CaM活性，因而不能确定血管收缩的抑制仅为TFP对CaM拮抗的结果。TFP对缺氧动物的血流动力学影响尚未见报道。为尽可能排除TFP对细胞膜$\alpha_1$受体阻断等作用所致的血流动力学影响，我们以脂质体包裹TFP后再注入动物体内。脂质体可通过内吞，融合等途经进入细胞，经溶酶体的作用裂解而释出内含物，为一携带各类物质(包括药物)进入细胞的良好手段。在大剂量注射脂质体时，肺内吸取率较高（达9.0～10.0%）

在本实验中，为缺氧家兔在模拟4000m高原注入脂质体包裹的TFP后Ppa无显著改变，PVR有增高趋势。观察45分钟末的肺动脉、肺和心肌组织CaM活性受到显著抑制。说明，缺氧性肺动脉压增高不一定依赖于CaM，缺氧还可通过其它调节机制和途径影响肺血管的收缩。Ebashi曾观察到某些血管平滑肌收缩不由CaM触发，而由平滑肌张力素系统完成。

注入脂质体包裹的TFP后，体循环血流动力学改变与肺循环相反。Pfa下降，SVR有降低趋势，CO降低。结果提示：心肌和体循环血管平滑肌与肺循环血管平滑肌收缩机制不尽一致，心肌和体循环血管平滑肌收缩对CaM的依赖性大于肺循环血管平滑肌。本实验结果也显示缺氧对肺循环和体循环血流动力学影响也不同。关于肺循环和体循环反应性的差异目前还不能作出完满解释。根据本实验结果，我们认为：肺、体循环血管平滑肌收缩调节的分子不尽一致，CaM在肺、体循环分布和作用的差异似为肺、体循环血管反应性差异的分子基础。这有待进一步实验证实。

（在本实验的CaM测定技术中，蒙徐州医学院生化室赵升德教授悉心指导，并为提供测定用试剂，特此致谢！也感谢本校免疫学教研室周凡同志的大力支持。）

## 参 考 文 献


1. 孙秉庸，等。缺氧性肺动脉和体动脉增压反应的研究——慢性间断性缺氧的影响及机制。病理生理学报 1985；1:8～13
2. Fishman AP, Hypoxia on pulmonary circulation—how and where it acts? Circ Res 1976;38:221～231
3. McMurtry IF, et al. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. Circ Res 1976;38:99～104
4. Means AR & Dedman JR. Calmodulin—an intracellular calcium receptor. Nature 1980; 285:73～77
5. Hartshorne DJ. Regulatory mechanisms in smoot muscle; The role of myosin phosphorylation. In "Smooth Muscle Contraction" edited by Newmanl Stephane. Marcel Dekker Inc. New York, 1984; 271～281
6. Farrukh IS, et al. Thromboxane-induced pulmonary vasoconstricton; involvement of calcium. J Appl Physiol 1985; 58: 34～44
7. Wallace RW, et al. Assay of calmodulin by $Ca^{++}$ - dependent phosphodiesterase. Methods in Enzymolgy 1983; 102:39～47
8. Conner J & Huang L. Efficient cytoplasmic delivery of fluorescence dye by pH-sensitive immunoliposomes. J Cell Biol 1985; 101: 582～589
9. Higaki J, et al. Calmodulin levels in hypertensive rats. Clinical Science 1985; 68: 407～410
10. Roufogalis RD. Specificity of trifluoperazine and related pheuothiazines for calcium-binding protein. In "Calcium & Cell Function" Vol III, edited by Cheung WY. Academic Press, New York, 1982:130～159
11. Papahadjopoulos D, et al. Optimization of liposomes as a carrier system for the intracellular delivery of drugs and macromolecules. In" Liposomes & Immunobiology" edited by Tom BH & Six HR. Elesevier/North-Holland, 1980: 151～164


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

## Calmodulin Levels and Effects of Calmodulin Antagonist on Hemodynamics in Hypoxic Rabbits

Cheng Jiangfan, et al (Department of Pathophysiology, Third Military Medical College)

The calmodulin levels of the pulmonary arteries, lungs and myocardial tissues from hypoxic rabbits and their controls were determined by phosphodiesterase activation, and the effects of trifluperazine (TFP), a calmodulin antagonist, on the hemodynamics of hypoxic animals were also examined. The results were: (1) No significant changes of calmodulin levels of 3 kinds of tissue were observed in rabbits exposeded to 4000m simulated altitude for 10 days; (2) Even though the administration of TFP encapsulated by phosphatidylcholine liposomes inhibited markedly the calmodulin activity on pulmonary arteries, it failed to diminish the hypoxic pressor response in rabbits. The results suggest that the hypoxic pulmonary vasoconstriction is independent from calmodulin to certain degree; (3) The pulmonary arterial pressure and pulmonary vascular resistance exhibited no significant changes during TFP treatment while the femoral arterial pressure and systemic vascular resistance decresed markedly. It strongly suggests that the pulmonary and systemic circulation do not share a common molecular mechanism of vasoconstriction.

**key words: hypoxia; Hemodynamics; Calmodulin; Calmodulin antagonist; Trifluperazine** (p.21)

## Macro-micro-anatomy of the Arterial Network around the wrist Joint

Li Zhenqian (Department of Anatomy, Third Military Medical College)

Fifty prepared specimens of adult upper extrimity were employed in the study. The arteries of each extremity were perfused with red latex and the dissection was carried out under an operating microscope.

Twelve arteries participate in the formation of the arterial network around the wrist joint. It consists of 5 divisions situated in different tissue layers, 3 on the dorsal and 2 on the palmar side of the extremity. The 2 divisions situated on the dorsal and palmar side of the joint capsule of the wrist respectively are the most completely constructed among the 5, and the main routes for the collateral circulation around the wrist.

The dorsal division of the carpal arterial network is mainly formed by the dorsal carpal branch of the radial artery, the dorsal branch of the anterior in-

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