若干扩血管因子在低氧脑血管扩张反应中的相互关系

顾正中　　梅小君　　吕　敏

（中国科学院上海生理研究所，上海　200031）

Interrelation of Some Vasodilative Factors in Responses of Hypoxic Cerebrovascular Dilatation

GU Zheng-Zhong, MEI Xiao-Jun and LU Min

(*Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031, *China*)

ABSTRACT

Aim　Previous studies have demonstrated that nitric oxide (NO) prostacyclin (PGI_2) and ATP-sensitive K^+ channel all participate in the regulation of hypoxic cerebrovascular dilatation, but the interrelations of them still keep unclear. The aim of the study is to investigate the interrelations of these three vasodilative factors under hypoxia.

Methods　The experiments were performed in newborn calf basilar arteral strips to observe the interrelations between NO and PGI_2, PGI_2 and ATP-sensitive K^+ channel, ATP-sensitive K^+ channel and NO, respectively, in hypoxic cerebrovascular dilatation (the hypoxic perfusion solation was prepared with PO_2 6.0 kPa, PCO_2 4.7 kPa, and pH 7.40±0.02).

Results　The NO had no effect of PGI_2, but dilatation induced by NO appears to depend on production of PGI_2, PGI_2 had no obvious effect on ATP-sensitive K^+ channel, but the effects of PGI_2 may be dependent on openning of ATP-sensitive K^+ channel; the effects of NO may be not directely mediated by openning of ATP-sensitive K^+ channel, and the activities of ATP-sensitive K^+ channel seem isolated from effect of NO.

Conclusions　The response of hypoxic cerebrovascular dilatation are influenced obviously by NO and PGI_2 except reaction induced by ATP-sensitive K^+ channel. There are some interrelative effects between NO and PGI_2, but the openning of ATP-sensitive K^+ channel in not influenced by them.

KEY WORD　Hypoxia;　Vasodilative factor;　Cerebrovessel

摘要　以往的研究已证明，一氧化氮、前列环素和ATP敏感K^+通道均参与低氧性脑血管扩张作用，然而它们之间的相互作用关系尚不清楚，这是本研究的目的。研究用初生小牛基底动脉血管条，观察低氧下（灌流溶液的氧分压为6.0 kPa，二氧化碳分压为4.7 kPa，pH为7.40±0.02）一氧化氮与前列环素，前列环素与ATP敏感K^+通道及ATP敏感K^+通道与一氧化氮在脑血管扩张反应中的相互关系。实验结果发现，一氧化氮对前列环素的作用无明显影响，而一氧化氮的作用似乎有赖于前列环素的存在；前列环素对ATP敏感K^+通道的活动影响不大，而前列环素对脑血管的作用可能有赖于ATP敏感K^+通道；一氧化氮的作用可能不是直接借助于ATP敏感K^+通道的作用，ATP敏感K^+通道的抑制对一氧化氮也无明显的影响。上述结果提示，在三种扩血管因素中，唯有ATP敏感K^+通道的开放所引起的扩血管反应没有受内皮细胞产生的一氧化氮和前列环素两个因子的明显影响，而其他两因子之间有相互的影响作用。

关键词　低氧；　扩血管因子；　脑血管

在以往整体[1~3]和离体[4,5]的实验研究中都已观察到一氧化氮(nitric oxide, NO)、前列环素(prostacyclin, PGI_2)和ATP敏感K^+通道(ATP-sensitive K^+ channel)均参与低氧脑血管扩张反应的调节，它们的抑制剂均可削弱低氧的扩血管作用。然而这三种扩血管因子在低氧脑血管扩张反应中的相互关系尚不清楚。本研究的目的是以初生小牛基底动脉离体血管条为实验标本，观察NO、PGI_2和ATP敏感K^+通道三者在低氧脑血管扩张反应中的相互

关系。

1　材料和方法

1.1　实验标本的制备

基底动脉取自当天出生的小牛，将剥离下来的基底动脉置于 4 ℃ Krebs 溶液[溶液配方(mmol/L)：NaCl 119，KCl 4.5，$MgCl_2$ 1.2，$NaHCO_3$ 25.0，NaH_2PO_4 10，$CaCl_2$ 1.5，Glucose 1.1]中，先将血管内瘀血清洗掉，然后小心地将基底动脉剪成 10 mm×2 mm 的螺旋条，悬挂于容积为 20 ml 的双层玻璃灌流容器中，用 37 ℃的 Krebs 溶液灌流，并通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气(溶液 PO_2＝77 kPa，PCO_2＝4.7 kPa，pH＝7.40±0.02)，作为对照条件。低氧条件是将 95% N_2 和 5%CO_2 混合气通入溶液(溶液 PO_2＝6.0 kPa，PCO_2＝4.7 kPa，pH＝7.40±0.02)。给予血管条 1.0 g 的静息张力，血管条在灌流液中平衡 2～3 h 后开始实验。血管条张力的变化通过 LW20-1 力位换能器(上海医用电子仪器厂生产)由 SEROGOR-1200 记录仪(奥地利生产)记录。

1.2　研究分组

本研究共分三组进行：NO 与 PGI_2 在低氧脑血管扩张中的相互关系；PGI_2 与 ATP 敏感 K^+ 通道在低氧脑血管扩张中的相互关系；ATP 敏感 K^+ 通道与 NO 在低氧脑血管扩张中的相互关系。

1.3　实验过程

血管条在静息张力条件下平衡后，分别用 30、60、90 和 120 mmol/L KCl 检验其最大张力。所有张力反应均以其占血管条对高 K^+(120 mmol/L KCl)最大张力反应的百分比表示，正值表示血管收缩，负值为血管扩张。用 Krebs 溶液洗去高 K^+，血管条在静息张力条件下重新平衡后，在低氧下按上述分组内容进行实验。先观察低氧下血管张力，然后在此基础上分别用不同的扩张因子抑制剂作用于血管条，观察血管张力变化及分析不同扩张因子间的相互关系。

1.4　抑制剂及其配制

一氧化氮合成酶(nitric oxide systhetase，NOS)抑制剂为 N-硝基-L-精氨酸(N-nitric-L-arginine，L-NNA，Sigma)，溶于三蒸水中。ATP 敏感 K^+ 通道抑制剂优降糖(Glybenciade，Gly，Sigma)，溶于二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide，DMSO)中，前列环素合成酶抑制剂消炎痛(Indomethacin，Indo，Sigma)溶于三蒸水中。灌流液中各种抑制剂的最终浓度为 10^{-6} mol/L。

1.5　统计分析

所有数据均以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用组间 t 检验并作统计学处理。

2　结果

2.1　一氧化氮与前列环素在低氧脑血管扩张中的相互关系

低氧下血管扩张，其张力值为－25.4%±6.3%，在此条件下灌流液中加入 NOS 抑制剂 L-NNA，血管扩张明显减弱，其张力值为－18.0%±4.2%，在此基础上灌流液中再加入 PGI_2 抑制剂消炎痛，血管扩张程度进一步减小，其张力值为－11.2%±5.3%，与低氧下加入 L-NNA 时的张力相比，差异十分显著。与低氧下消炎痛单独作用于血管时所引起的效应基本相似(表 1，Table 1)，即 NO 的作用被抑制后，PGI_2 的作用仍然存在。表明 NO 对 PGI_2 的作用无明显影响。反之，在低氧下灌流液中如先给消炎痛，血管张力由单独低氧时的－22.4%±5.6%变为－14.8%±4.4%，在此基础上再给予 L-NNA，则血管张力不发生明显变化，其值为－13.7%±3.5%。此值与前者无明显差异，表明 NO 的作用被 PGI_2 抑制剂所抑制，NO 的作用似乎有赖于 PGI_2 的存在。

Table 1.　Interrelatin between NO and PGI_2 in hypoxic cerebrovascular dilatation

Experimental conditions	n	Vascular tension(%)
Hypoxia	5	－25.4+6.3
Hypoxia+L-NNA	5	－18.0+4.2^c
Hypoxia+L-NNA+Indo	4	－11.2+5.3^b
HyPoxia	6	－22.4+5.6
Hypoxia+Indo	4	－14.8+4.4^c
Hypoxia+Indo+L-NNA	4	－13.7+3.5^a

c：Compared with hypoxia，$P<0.01$；　b Compared with hypoxia＋L-NNA，$P<0.05$；　a Compared with hypoxia＋Indo，no statistic difference.

2.2　前列环素与 ATP 敏感 K^+ 通道在低氧脑血管扩张中的相互关系

低氧下 PGI_2 抑制剂消炎痛可明显减弱低

氧引起的扩血管作用，其血管张力值从－22.4%±4.6%减小至－16.6%±4.1%，在此基础上再给以ATP敏感K^+通道抑制剂优降糖，血管扩张进一步减弱，其张力值为－14.0%±2.7%，虽然变化值不大，但与前者相比仍有统计学差异，表明PGI_2对ATP敏感K^+通道的影响不大，若在低氧下先给以优降糖，低氧引起的血管扩张明显减弱，由－27.6%±4.3%减小至－18.1%±3.8%，在此基础上再给以消炎痛，则未观察到血管张力有进一步的明显变化。其张力值为－17.5%±3.2%，与前者相比无显著性差异($P>0.05$)(表2，Table 2)。此结果表明PGI_2对脑血管的作用可能有赖于ATP敏感K^+通道。

Table 2. Interrelatin between PGI_2 and ATP-sensitive K^+ channel in hypoxic cerebrovascular dilatation.

Experimental conditions	*n*	Vascular tension(%)
Hypoxia	10	－22.4+4.6
Hypoxia＋Indo	9	－16.6+4.1[c]
Hypoxia＋Indo＋Gly	9	－14.0+2.7[bc]
Hypoxia	5	－27.6+4.3
Hypoxia＋Gly	5	－18.1±3.8[c]
Hypoxia＋Gly＋Indo	5	－17.5±3.2[ac]

c: Compared with hypoxia, $P<0.01$; b: Compared with hypoxia＋Indo, $P<0.05$; a: Compared with hypoxia＋Gly, no statiatics difference.

2.3 一氧化氮与ATP敏感K^+通道在低氧脑血管扩张中的相互关系

在2.1中已经提到NOS抑制剂L-NNA可明显减小低氧引起的血管扩张，在此条件下如给以ATP敏感K^+通道抑制剂优降糖仍继续减小血管扩张，其变化值见表3(Table 3)。表明NO的作用可能不是借助于ATP敏感K^+通道的作用实现的；如在低氧下先给以优降糖，再给以L-NNA，则L-NNA同样有削弱血管扩张的作用，表明ATP敏感K^+通道的开放与否对低氧下NO的舒血管作用也无明显影响(表3，Table 3)。

Table 3. Interrelation between NO and ATP-sensitive K^+ channel in hypoxic cerebrovascular dilatation

Experimental conditions	*n*	Vascular tension(%)
Hypoxia	10	－22.4+4.6
Hypoxia＋L-NNA	10	－16.0+3.3[b]
Hypoxia＋L-NNA＋Gly	10	－7.0+2.9[d]
Hypoxia	6	－275+5.8
Hypoxia＋Gly	4	－14.0±3.4[c]
Hypoxia＋Gly＋L-NNA	4	－7.1±2.3[e]

c: Compared with hypoxia, $P<0.01$; b: Compared with hypoxia, $P<0.05$; d: Compared with hypoxia＋L－NNA, $P<0.05$; e: Compared with hypoxia＋Gly, $P<0.01$.

3 讨论

低氧能直接舒张离体脑动脉，主要通过血管平滑肌细胞的超极化或通过释放内皮舒张因子。NO与PGI_2均是由内皮细胞产生的血管舒张因子。NO在内皮细胞中产生后透过细胞膜并扩散至平滑肌细胞内。NO作用于平滑肌细胞内的水溶性鸟苷酸环化酶，使胞内cGMP水平升高，细胞内Ca^{2+}浓度下降，从而引起平滑肌的舒张。而PGI_2是通过使细胞内cGMP升高，激活蛋白激酶A，使肌球蛋白脱磷酸化，导致平滑肌舒张。Rosenblum等[6]在消炎痛和超氧化物歧化酶可取消L-NMMA的收缩效应的实验基础上提出一种机制，认为NOS抑制剂L-NMMA收缩血管的作用不仅通过直接对NOS的抑制而且还通过刺激环氧化物酶，随后有氧自由基的形成，破坏NO，引起血管收缩。但有研究者认为[7]，消炎痛与L-NMMA的作用是独立的，相互不影响。本研究结果表明，NO的作用似乎有赖于PGI_2的存在，低氧下如先给以PGI_2的抑制剂消炎痛后，再给以NOS抑制剂L-NNA，则L-NNA不再引起缩血管反应，内皮舒张因子NO介导的血管对低氧引起的舒张反应可能是通过环氧化物酶通路的血管扩张物质来实现的。

低氧时血管扩张被 ATP 敏感 K^+ 通道的激活所介导[3]。Fredicks 等[8]观察到 ATP 敏感 K^+ 通道抑制剂优降糖也抑制血管对 PGI_2 类似物 Iloprost 引起的血管舒张反应。本研究亦观察到低氧下一旦优降糖抑制 ATP 敏感 K^+ 通道的作用后，再用 PGI_2 抑制剂消炎痛，不会再引起低氧扩血管反应的进一步减弱，PGI_2 作为内皮细胞的产物，其作用有赖于 ATP 敏感 K^+ 通道的存在。由于 ATP 敏感 K^+ 通道的开放直接介导低氧时血管平滑肌的舒张，因此 ATP 敏感 K^+ 通道作用被抑制后，PGI_2 难以引起平滑肌舒张，以往本研究组已观察到优降糖可大幅度地抑制低氧引起的基底动脉扩张[5]，去除内皮细胞后，优降糖仍有一定程度的作用。但其强度比内皮细胞完整时要小，表明低氧下 ATP 敏感 K^+ 通道的激活既有依赖于内皮细胞的成分，也有不依赖于内皮细胞的成分。因此在消炎痛作用后，再施于优降糖虽对低氧下脑血管扩张反应仍有显著性影响，但其幅度明显小于优降糖单独作用时的反应。

一氧化氮不可能激活脑血管壁细胞的 K^+ 通道[9]。Faraci 等[10]观察到优降糖并不抑制脑血管对 NO 的扩血管反应。在本研究中也观察到 NO 与 ATP 敏感 K^+ 通道在低氧脑血管扩张反应中均互不产生影响。由此看来，在三种扩血管因子中唯有 ATP 敏感 K^+ 通道的开放所引起的扩血管反应没有受内皮细胞产生的 NO 与 PGI_2 两个因子的明显影响。推测，低氧可直接激活血管平滑肌上细胞的 ATP 敏感 K^+ 通道而产生舒张。本文仅对三个扩血管因子在低氧脑血管扩张反应中的相互关系作了初步的观察和分析，但对它们之间的相互作用机制尚待作进一步的深入的研究。

参考文献

1 Kozniewaka E, Oseka M, Styo T. Effects of endothelium-derived NO on cerebral circulation during nomoxia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow & Metab*, 1992, **12**: 311～317.

2 Ellio EF, Wei EP, Kontos HA. Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D_2, E_2, G_2 and I_2. *Am J Physiol*, 1993, **237** :H381～385.

3 Taguchi H, Heistad DD. ATP-sensitive K^+ channels mediate dilatation of cerebral arterioles during hypoxia. *Circ Res*, 1994, **74**: 1 005～008.

4 顾正中，梅小君，钟凯声，吕 敏，等. 一氧化氮参与低氧脑血管张力的调节. 生理学报，1996, **48**: 209～216.

5 梅小君，顾正中. ATP 敏感钾通道参与调节低 O_2、高 CO_2 引起的脑血管扩张反应. 科学通报，1996, **41**: 1 887～890.

6 Rosenblum WI, Nishimara H, Nelson GH. L-NMMA in brain microcirculation of mice is inhibited by blocked of cyclooxygenase and superoxide dismutase. *Am J Physiol*, 1992, **226**: H 1 343～349.

7 Kimura M, Dietrich HH, Dacey RG. Nitric oxide regulates cerebral arteriolar tone in rats. *Stroke*, 1994, **25**: 2 227～233.

8 Fredricks KT, Liu Y, Rusck NY, et al. Role of endothelium and arteral K^+ channels in mediating hypoxic dilation of middle cerebral arteries. *Am J Physiol*, 1994, **267**: H580～586.

9 Plone F, Garland CJ. Differential effects of acetylcholine, nitric oxide and levcromakalism on smooth muscle membrane potential and tone in the rabbit basilar artery. *Br J Pharmacol*, 1993, **110**: 651～656.

10 Faraci FM, Heistad DD. Role of ATP-sensitive potassium channels in the basilar artery. *Am J Physiol*, 1993, **264** : H8～13.

(1997-02-26 收到)