

[文章编号] 1007-3949(2011)19-11-0915-04

• 实验研究 •

利钠肽 C 受体介导 C 型利钠肽舒张猪冠状动脉的作用机制

李其勇, 姜荣建, 舒燕, 孔洪, 赖金川, 程标

(四川省医学科学院 四川省人民医院心内科, 四川省成都市 610072)

[关键词] C 型利钠肽; C 型利钠肽受体; 冠状动脉

[摘要] 目的 探讨利钠肽 C 受体(NPR-C)途径在 C 型利钠肽(CNP)舒张猪冠状动脉中的作用机制。方法 采用猪冠状动脉环张力测定法,观察 CNP 和 NPR-C 激动剂 cANF4-23 对猪冠状动脉的舒张作用,然后加入 NPR-C 阻断剂 cANF4-28、Gi 蛋白阻断剂百日咳毒素(PTx)和四种钾通道阻断剂,观察对两者舒张血管效应的影响。结果 10^{-6} mol/L 的 CNP 和 cANF4-23 对血管的最大舒张率分别为 $36.51\% \pm 3.96\%$ 和 $42.37\% \pm 17.60\%$,两组舒张血管作用比较差异无统计学意义($P > 0.05$);cANF4-28 和 PTx 均能降低 CNP 和 cANF4-23 的舒张血管作用($P < 0.05$);四乙胺、格列苯脲或氯化钡均能明显抑制 CNP 的血管舒张作用($P < 0.05$);氯化钡使 cANF4-23 的血管舒张作用明显降低($P < 0.05$)。结论 NPR-C 受体途径的舒张血管作用可能是通过 Gi 蛋白耦联内向整流钾通道实现的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Natriuretic Peptide Receptor-C Mediated Vasodilatory Mechanisms of C-type Natriuretic Peptide in Porcine Coronary Artery

LI Qi-Yong, JIANG Rong-Jian, SHU Yan, KONG Hong, LAI Jin-Chuan, and CHENG Biao

(Department of Cardiology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China)

[KEY WORDS] C-type Natriuretic Peptide; C-type Natriuretic Peptide Receptor; Coronary Artery

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the vasodilatory mechanisms of C-type natriuretic peptide (CNP) via the natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) pathway. **Methods** This study was performed on the porcine coronary artery rings, and the tension changes of coronary artery ring were recorded with the presence of CNP or NPR-C agonist (cANF4-23), further NPR-C antagonist (cANF4-28), Gi protein blocker (pertussis toxin, PTx) and four types of potassium channel blocker were used to explore the vasodilatory mechanisms. **Results** Vasorelaxant activities to 10^{-6} mol/L CNP and cANF4-23 were $36.51\% \pm 3.96\%$ and $42.37\% \pm 17.60\%$ respectively ($P > 0.05$); cANF4-28 or PTx can attenuate the action of both CNP and cANF4-23 ($P < 0.05$); Tetraethylammonium, Glibenclamide or BaCl_2 all can attenuate the relaxant activity of CNP ($P < 0.05$), but only BaCl_2 decreased the vasodilatory action of cANF4-23 ($P < 0.05$). **Conclusions** Activation of the G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel (GIRK) maybe account for the vasodilatory action of CNP via the NPR-C pathway.

C 型利钠肽 (C-type natriuretic peptide, CNP) 是利钠肽家族中的一员,主要由血管内皮细胞通过自分泌和旁分泌的形式作用于自身和邻近细胞,具有舒张血管、促进内皮细胞再生、抑制平滑肌细胞增殖和迁移、调节血压和心肌收缩力等多重作用^[1]。既往认为 CNP 仅与 B 型利钠肽受体 (B-type natriuretic peptide receptor, NPR-B) 结合通过鸟苷酸环化酶/蛋

白激酶 G (GC/PKG) 途径发挥生物学效应;而在利钠肽受体中占 90% 的 C 型利钠肽受体 (C-type natriuretic peptide receptor, NPR-C) 由于不具有鸟苷酸环化酶的胞内结构域仅参与利钠肽的清除。新近研究发现, NPR-C 存在 Gi 蛋白区,在心肌细胞中观察到 CNP 可通过抑制腺苷酸环化酶或激活磷脂酶 C 发挥作用^[2]。Hobbs 等^[3]发现在鼠心灌流液中加入

[收稿日期] 2011-05-30

[作者简介] 李其勇, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病介入治疗研究, E-mail 为 lqyedu@163.com。通讯作者姜荣建, 主任医师, 主要从事冠心病及结构性心脏病研究, E-mail 为 jrjian541201@126.com。舒燕, 硕士, 副主任医师, 主要从事冠心病及结构性心脏病研究, E-mail 为 scshuyan@sina.cn。

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。本研究观察 NPR-C 受体途径在 CNP 舒张猪冠状动脉血管环中的作用,旨在探讨其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验药品

CNP、NPR-C 阻断剂 cANF (4-28)、NPR-C 激动剂 cANF (4-23) 均由成都凯捷生物医药科技发展有限公司合成;百日咳毒素 (Pertussis Toxin, PTx) 和各种钾通道阻断剂四乙胺 (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;余为国产分析纯。

1.2 溶液的配制

CNP、cANF (4-28)、cANF (4-23) 实验前用双蒸水配成 10⁻³ mol/L 原液,实验时加入溶液,工作浓度为 10⁻⁶ mol/L。Krebs 液成分 (单位:mmol/L): NaCl 114.0, NaHCO₃ 18, NaH₂PO₄ 1.8, KCl 4.7, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, Glucose 11.5, pH 值为 7.4。

1.3 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),采用 BL-410 型生物机能实验系统 (成都泰盟) 观察血管张力。给血管环 1g 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 min

换 1 次,并使前负荷维持在 0.5 g 以上。加 10 μmol/L 的去甲肾上腺素 (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 × 100%。试验前用细棉签轻擦内皮面数次去除内皮,使用 10 μmol/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。

1.4 统计学处理

所有实验数据均采用 SPSS 18.0 软件包进行统计。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多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 CNP 和 cANF4-23 对猪冠状动脉环的舒张作用

10⁻⁶ mol/L 的 CNP 或 10⁻⁶ mol/L 的 cANF4-23 对血管环均产生了明显的舒张效应,其最大舒张率分别为 36.51% ± 3.96% (*n* = 10) 和 42.37% ± 17.60% (*n* = 10),两组舒张血管作用比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。cANF4-23 对冠脉的舒张作用证实在猪冠状动脉有 NPR-C 受体表达,且 NPR-C 受体的激活可以引起猪冠脉血管的舒张。

2.2 cANF4-28、PTx 对 CNP 和 cANF4-23 舒张猪冠脉血管作用的影响

在溶液中预先加入 cANF4-28 (10⁻⁶ mol/L) 或 PTx (500 μg/L),待稳定后再分别加入 CNP 或 cANF4-23,发现无论是加入 cANF4-28 或 PTx 后,CNP 和 cANF4-23 对猪冠脉血管的最大舒张率均有明显下降 (*P* < 0.05, *n* = 10; 表 1)。

表 1. CNP 和 cANF4-23 对猪冠脉环的舒张作用及 cANF4-28、PTx 和各种钾通道阻断剂对其最大舒张率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1. Effects of cANF4-28, PTx and four types of potassium channel blocker on the maximal vasorelaxant activities imposed by CNP or cANF4-23

分 组	基础值	cANF4-28	百日咳毒素	四乙胺	格列苯脲	氯化钡	4-氨基吡啶
CNP	36.5% ± 4.0%	21.3% ± 10.3% ^a	13.5% ± 3.9% ^a	22.9% ± 9.8% ^a	23.7% ± 8.4% ^a	12.3% ± 3.8% ^a	34.5% ± 13.7%
cANF4-23	42.4% ± 17.6%	12.2% ± 4.6% ^a	23.3% ± 8.1% ^a	39.5% ± 10.1%	39.2% ± 7.3%	27.4% ± 10.9% ^a	40.2% ± 14.6%

a 为 *P* < 0.05,与基础值比较。

2.3 各种钾通道阻断剂对 CNP 和 cANF4-23 舒张猪冠脉血管作用的影响

在溶液中预先分别加入各种钾通道阻断剂 (钙

激活钾通道阻断剂 TEA (10 mmol/L)、ATP 敏感钾通道阻断剂格列苯脲 (10 μmol/L)、内向整流钾通道阻断剂氯化钡 (1 mmol/L)、电压依赖性钾通道阻

断剂 4-AP (1 mmol/L), 待稳定后再分别加入 CNP 或 cANF4-23, 发现预先加入 TEA、格列苯脲或氯化钡均使 CNP 组血管舒张作用明显下降 ($P < 0.05, n = 10$), 而预先加入 4-氨基吡啶对 CNP 血管舒张作用无明显影响 ($P > 0.05, n = 10$); cANF4-23 组加入氯化钡后血管舒张作用明显下降 ($P < 0.05, n = 10$), 而其他钾通道阻断剂对其舒张血管作用均无明显影响 ($P > 0.05, n = 10$; 图 1)。

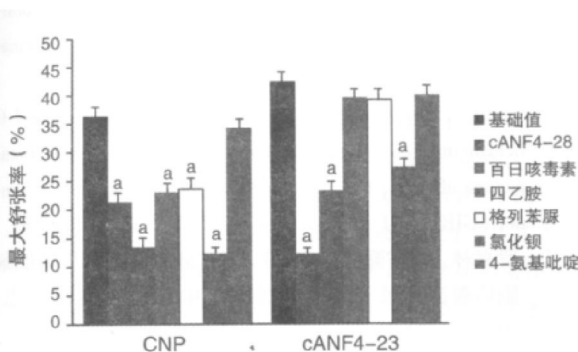


图 1. CNP 和 cANF4-23 对猪冠状动脉的舒张作用及 cANF4-28、PTx 和各种钾通道阻断剂对最大舒张率的影响 a 为 $P < 0.05$, 与基础值比较, $n = 10$ 。

Figure 1. Effects of cANF4-28, PTx and four types of potassium channel blocker on the maximal vasorelaxant activities imposed by CNP or cANF4-23

3 讨论

哺乳动物体内有 3 种利钠肽受体亚型即 NPR-A、NPR-B、NPR-C。其中 NPR-A 和 NPR-B 为功能性受体, 与配体结合后与鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 耦联, 通过环磷鸟苷/蛋白激酶 G (cGMP/PKG) 途径起作用, 又称为 GC 受体; NPR-C 不具有 GC 的胞内结构域, 与配体结合后通过内化进入溶酶体而达到水解配体作用, 故称为清除受体。但 Chauhan 等^[4] 在鼠肠系膜动脉环的实验中加入 NPR-A/B 抑制剂 HS-142-1, CNP 舒张血管效应未受影响; 加入 cANF4-23 后出现和 CNP 相似的舒张血管作用, 提示 CNP 的舒张血管作用可能和 NPR-C 相关。本研究发现在猪冠状动脉上 NPR-C 受体激动剂 cANF4-23 具有与 CNP 类似的舒张血管能力, 提示在猪冠状动脉有 NPR-C 受体表达, 且 NPR-C 受体的激活可以引起猪冠状动脉血管的舒张。预先在溶液中加入 NPR-C 阻断剂 cANF4-28 后, CNP 的血管舒张作用明显受抑制, 说明 NPR-C 参与了 CNP 对血管舒张的调节。但 cANF4-28 不能完全阻断

CNP 的舒张血管作用, 提示 NPR-B 也可能参与了舒张血管作用。

钾电流是调节血管平滑肌细胞膜电位的主要因素, 钾通道开放引起细胞膜超极化, 抑制电压依赖性钙通道开放, 导致血管舒张^[5,6]。血管平滑肌细胞膜上主要存在 4 种钾通道: 电压依赖性钾通道 (voltage-activated potassium channel, KV)、钙激活钾通道 (Ca^{2+} activated K^+ channel, KCa)、内向整流钾通道 (inward rectified potassium channel, KIR) 和 ATP 敏感钾通道 (ATP sensitive potassium channel, KATP)^[5,6]。Garcha 等^[7] 发现 CNP 能结合 NPR-B 通过 GC/cGMP 途径激活 KCa 舒张人皮下阻力血管, 该效应可被 KCa 特异性阻断剂 iberiotoxin 阻断。Leuranguer 等^[8] 发现格列苯脲可以阻断 CNP 对豚鼠颈动脉平滑肌细胞所产生的超极化作用, 提示 KATP 参与了 CNP 的舒张血管作用。本研究预先在溶液中分别加入各种钾通道的阻断剂, 然后观察 CNP 和 cANF4-23 舒张血管作用的变化, 发现预先加入 TEA 或格列苯脲均使 CNP 组血管舒张作用明显下降, 提示 KCa 和 KATP 可能参与了 CNP 的舒张血管作用, 这与以上的研究结果一致。同时我们也观察到加入氯化钡后 CNP 和 cANF4-23 舒张血管作用均明显受影响, 而加入 TEA 或格列苯脲对 cANF4-23 舒张血管作用无显著影响, 提示 NPR-C 受体途径的舒张血管作用可能与 KIR 的激活有关, 而 CNP 组表现出对多种钾通道阻断剂的敏感性可能与其作用 NPR-B 和 NPR-C 两类受体有关。

KIR 是细胞膜超极化激活的一种钾通道, 由于其具内向整流特性而得名, 可被细胞外 Ba^{2+} 阻断, 其通道电流又称背景电流, 生理状态下主要维持静息膜电位。KIR 包括 7 个亚家族, G 蛋白耦联内向整流钾通道 (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, GIRK) 属其中一员, 在血管中可通过 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基激活 GIRK, 引起细胞膜超极化而舒张血管^[9]。NPR-C 存在 Gi 蛋白区, Chauhan 等^[4] 发现 CNP 对鼠肠系膜动脉的舒张作用可被 Gi 抑制剂 PTx 所阻断。本研究在溶液中预先加入 PTx 后发现 CNP 和 cANF4-23 的舒张血管作用明显下降, 提示 Gi 蛋白参与了 NPR-C 受体途径的舒张血管作用, 这与 Chauhan 等的研究结果一致。进一步使用钾通道阻断剂后发现 NPR-C 途径的舒张血管作用与 KIR 的有关, 提示 NPR-C 受体途径的舒张血管作用可能是通过 Gi 蛋白耦联内向整流钾通道实现的。

冠状动脉痉挛、狭窄等因素致心肌缺血时, 局部出现缺氧、酸中毒、血钾升高和 ATP 水平下降, 可引

起 KCa、KATP 和 KIR 等多种钾通道的激活^[10,11], CNP 能通过 NPR-B 和 NPR-C 受体开放多种钾通道舒张冠脉血管改善心肌缺血,必将成为新一代治疗冠心病的药物。

[参考文献]

- [1] Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. Atrial natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, 191: 341-366.
- [2] Tsujino M, Hirata Y. Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), C-type natriuretic peptide (CNP) [J]. *Nippon Rinsho*, 2010, 68: 619-622.
- [3] 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: 1 231-235.
- [4] Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, et al. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor [J]. *PNAS*, 2003, 100: 1 426-431.
- [5] 罗兴林, 李秀芹, 杨艳. 主动脉平滑肌钙激活钾通道的增龄变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13: 545-548.
- [6] 陈菊屏, 熊瑛, 刘远厚, 等. 动脉粥样硬化兔血管平滑肌大电导钙激活钾通道的活性及其对硝酸甘油反应的探讨 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16: 1 806-810.
- [7] Garcha RS, Hughes AD. CNP, but not ANP or BNP, Relax Human Isolated Subcutaneous Resistance Arteries by an Action Involving Cyclic GMP and BKCa Channels [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2006, 7(2): 87-91.
- [8] Leuranguer V, Vanhoutte PM, Verbeuren T, et al. C-type natriuretic peptide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153: 57-65.
- [9] Berlin S, Keren-Raifman T, Castel R. G alpha (i) and G betagamma jointly regulate the conformations of a G beta-gamma effector, the neuronal G protein-activated K⁺ channel (GIRK) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 6 179-185.
- [10] 罗兴林, 魏宗德, 饶华, 等. 正常肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性的观察. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9: 24-26.
- [11] 欧阳迎春, 郭长磊, 刘应才, 等. 17β-雌二醇舒张人肠系膜动脉与钙激活钾通道及 ATP 敏感钾通道的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19: 2 768-772.

(此文编辑 李小玲)