

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00162

阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉收缩与舒张功能的变化

吴刚, 徐学武, 缪雪荣, 杨立群, 李泉, 俞卫锋*

第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

[摘要] **目的:** 研究阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉收缩及舒张功能的变化规律, 探讨高胆红素血症导致阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉收缩及舒张功能变化的可能机制。 **方法:** 60只雄性SD大鼠随机分为胆总管结扎(BDL)组和假手术(SO)组, 每组30只, 术后3、7、14 d, 取大鼠离体胸主动脉环, 分别测定大鼠胸主动脉对高浓度钾离子(K⁺)诱发的最大收缩幅度、梯度浓度去甲肾上腺素(NE)和去氧肾上腺素(PE)引起的收缩反应以及硝普钠(SNP)引起的舒张反应。另取40只雄性SD大鼠, 随机分为SO组、BDL 3 d组、BDL 7 d组、BDL 14 d组, 每组10只。取大鼠的胸主动脉组织, 利用Western印迹方法检测大鼠胸主动脉肾上腺素α_{1D}受体亚型(α_{1D}-AR)蛋白表达情况。 **结果:** 高钾离子、NE、PE在BDL大鼠离体胸主动脉引起的收缩反应弱于SO组, 而硝普钠引起的舒张反应强于SO组; BDL组大鼠α_{1D}-AR蛋白表达较SO组减弱, 并且随阻塞时间的延长, 减弱更加明显。 **结论:** BDL大鼠离体胸主动脉的收缩与舒张功能在高胆红素血症时发生改变, α_{1D}-AR蛋白表达下降可能是收缩功能减弱的原因之一。

[关键词] 阻塞性黄疸; 胸主动脉; 血管收缩; 血管舒张

[中图分类号] R 575.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0162-04

Changes of vasoconstrictor and vasodilator functions of isolated thoracic aorta rings in rats with obstructive jaundice

WU Gang, XU Xue-wu, MIAO Xue-rong, YANG Li-qun, LI Quan, YU Wei-feng*

Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the changes of vasoconstrictor and vasodilator functions of isolated thoracic aorta in the rats with obstructive jaundice, so as to study the mechanism for the functional changes of the aorta in rats with obstructive jaundice. **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into bile duct ligation (BDL) group and sham operation (SO) group. The thoracic aortas were isolated at 3, 7 and 14 d after surgery and the vasoconstrictor responses induced by high potassium, norepinephrine (NE) and phenylephrine (PE) gradient and the vasodilator response to SNP were tested. Another 40 male SD rats were randomly divided into BDL three-day group, BDL seven-day group, BDL 14-day group and sham operation (SO) group. The expression of α_{1D}-AR protein in the thoracic aorta was assessed by Western blotting. **Results:** The vasoconstrictor responses of thoracic aorta rings in high potassium, NE, PE, and BDL rats were weaker than those in the SO group. The vasodilator response induced by SNP in the BDL group was greater than that in the SO group. The expression of α_{1D}-AR protein in the BDL group was weaker than that in the SO group, and the expression decreased with the prolongation of obstructive time. **Conclusion:** The systolic and diastolic functions of isolated thoracic aorta rings are changed in cholestatic rats; the weakened systolic function might be a result of decreased expression of α_{1D}-AR albumen.

[KEY WORDS] obstructive jaundice; thoracic aorta; vasoconstriction; vasodilation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2): 162-165]

阻塞性黄疸时患者胃肠道因胆汁缺乏而刺激细菌增殖和易位^[1-2], 引发革兰阴性细菌感染, 导致内毒素进入门脉系统和体循环从而发生内毒素血症^[3]。同时总胆红素、胆汁酸、内毒素和 TNF-α 水平增高, 也可以使体内产生大量超氧自由基, 造成组织和细胞的损害, 影响器官的功能, 导致患者心率减

慢、心肌收缩功能减退、体循环压力降低等血流动力学的变化。既往对血管功能的变化研究较少, 本实验旨在通过建立阻塞性黄疸大鼠模型, 观察阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉对血管活性药物反应性的变化, 并初步探讨其改变的可能机制。

[收稿日期] 2008-07-09 **[接受日期]** 2008-09-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30600584), Supported by National Natural Science Foundation of China(30600584).

[作者简介] 吴刚, 硕士. E-mail: wugang_123199@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870783, E-mail: ywf808@sohu.com

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂和动物 电泳仪(Bio-Rad公司); MedLab U/4c501生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司)等。一抗 anti- α_{1D} -AR、二抗 donkey anti-goat IgG(Santa Cruz公司); 去甲肾上腺素(NE)、去氧肾上腺素(PE),上海禾丰制药有限公司; 硝普钠(SNP),武汉人福药业有限责任公司。成年雄性SD大鼠100只,体质量180~220 g,由上海中国医学科学院实验动物中心提供,SPF级饲养,室温22~25℃,湿度40%~60%,自由进水和食物,由第二军医大学实验动物中心饲养。

1.2 BDL大鼠的制备 雄性SD大鼠随机分为假手术组和胆总管结扎组,称质量后进行麻醉(戊巴比妥钠,40~60 mg/kg,腹腔内注射)。消毒、铺巾后,打开腹腔,游离胆总管,近肝门处用1-0号丝线结扎两道,近十二指肠处结扎一道,于结扎点中间剪断胆总管,逐层关闭腹腔。假手术组大鼠在开腹后同样方法游离胆总管,但不进行结扎和剪断胆总管。手术完毕后,各只动物均肌肉注射青霉素8万U预防感染。

1.3 一般情况观察 观察大鼠活动度、饮食情况、毛发及其皮肤的颜色,计算各相应时间点大鼠的死亡率。取标本时肉眼观察胸腹腔脏器的一般情况,并于下腔静脉取血3 ml测定血中胆红素含量。

1.4 胸主动脉收缩和舒张功能测定 迅速打开胸腔,取位置相对固定的胸主动脉条上段,移入含95% O₂、5%CO₂饱和的Krebs-Henseleit营养液[K-H液,组成(mol/L):KCl 4.7,NaCl 118.3,CaCl₂ 2.5,MgSO₄ 1.2,KH₂PO₄ 1.2,NaHCO₃ 25.0,无水葡萄糖 5.6]的培养皿内(37℃),仔细剔除黏附于胸主动脉周围的脂肪组织,截取3~5 mm长的胸主动脉环。随后用自制金属钩将动脉环悬置于含K-H液、95%O₂、5%CO₂的37℃水浴槽中,另一端连接张力换能器和台式平衡记录仪,调节静息张力2 g,稳定60 min,每隔15 min换液1次。分3次加入高钾离子溶液(60 mol/L),每次间隔5 min,记录最大收缩幅度值为k1、k2、k3。用K-H液冲洗血管条至零点,稳定30 min,分别加入不同浓度梯度PE(10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L)、NE(10⁻¹⁰~10⁻⁵ mol/L)制作动脉环收缩反应的量-效曲线。用10⁻⁶ mol/L的NE溶液诱发血管条到最大收缩幅度,此值计为100%。稳定5 min后,逐渐加入SNP溶液,使浴槽中SNP溶液浓度为(10⁻⁹~10⁻⁵)mol/L,记录加入SNP后血管的舒张百分比。每次更换不同溶液后均需用K-H液冲洗血管条至零点,稳定30 min调零后方可继续测量。

1.5 检测大鼠胸主动脉 α_{1D} -AR蛋白 另取雄性SD大鼠40只,随机分为SO组、BDL 3 d组(BDL3)、BDL 7 d组(BDL7)、BDL 14 d组(BDL14),每组10只。取位置相对固定的胸主动脉条上段置于-80℃液氮罐中保存,SO组大鼠可在术后3、7、14 d分别处死3、3、4只,用Western印迹方法检测血管平滑肌细胞中 α_{1D} -AR蛋白的表达情况。

1.6 统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用非配对资料 t 检验进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 一般情况 黄疸7 d组和14 d组的大鼠各有1只死于胆瘘而退出实验。胆总管结扎24 h后,大鼠尿液颜色开始变黄;3~4 d时全身肤色开始变黄,食欲逐渐下降;术后1~2周近肝脏胆总管残端呈囊状扩张,直径可达0.9~1.4 cm。二次手术可见:黄疸3 d组开始有明显的腥臭味,腹腔有少许液体渗出。肝脏弥漫性肿大,质地变硬呈深黄褐色。

2.2 血清胆红素含量 BDL组血清总胆红素含量与假手术组比较明显升高($P < 0.01$),BDL3组(143.36 ± 43.22, $n=10$)明显高于BDL7组(88.69 ± 20.17, $n=9$)和BDL14组(87.56 ± 19.32, $n=9$, $P < 0.01$)。SO组3、7、14 d血清总胆红素含量分别为(7.699 ± 1.233)、(6.932 ± 1.304)、(7.396 ± 1.195) $\mu\text{mol/L}$ 。BDL7组和BDL14组无统计学差异($P > 0.05$)。假手术组各时间点间比较无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 胸主动脉收缩和舒张功能

2.3.1 高K⁺诱发最大收缩幅度 BDL组较SO组的收缩幅度明显减弱($P < 0.01$),BDL组和SO组组内各时间点比较无统计学意义($P > 0.05$),连续3次刺激间比较无统计学意义($P > 0.05$),结果见表1。

表1 高K⁺在不同时间点诱发胸主动脉最大收缩幅度

Tab 1 Maximum contraction extent induced by increased potassium at different time points

		(n=10, $\bar{x} \pm s$, m/g)	
Time t/d		BDL	SO
3	k1	1.189 9 ± 0.300 8**	1.617 7 ± 0.507 3
	k2	1.220 7 ± 0.313 7**	1.760 8 ± 0.432 1
	k3	1.118 1 ± 0.388 0**	1.734 8 ± 0.467 8
7	k1	1.054 6 ± 0.361 4**	1.672 3 ± 0.411 7
	k2	1.159 8 ± 0.359 7**	1.636 2 ± 0.398 7
	k3	1.126 5 ± 0.340 4**	1.665 6 ± 0.329 0
14	k1	1.070 1 ± 0.196 0**	1.702 1 ± 0.419 9
	k2	1.142 1 ± 0.184 2**	1.841 3 ± 0.424 2
	k3	1.142 8 ± 0.181 6**	1.886 9 ± 0.340 3

** $P < 0.01$ vs SO group. BDL: Bile duct ligation; SO: Sham operation group

2.3.2 PE收缩血管反应 BDL组较SO组在同一时间点的收缩反应明显减弱($P < 0.01$),在低浓度时BDL组间在不同时间点上比较没有统计学意义($P > 0.05$),在PE浓度大于 10^{-6} mol/L时,BDL3组收缩反应较BDL7组和BDL14组增强($P < 0.05$)。SO组在不同时间点上比较无统计学差异($P > 0.05$)。结果见图1。

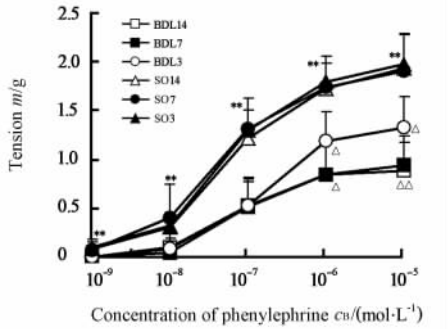


图1 大鼠胸主动脉环对去氧肾上腺素的反应
Fig 1 Response elicited by phenylephrine in rat thoracic aortic rings

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BDL3, BDL7, or BDL14 group of same time point; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs BDL3 group. BDL7 and BDL14 group: $n = 9, \bar{x} \pm s$; other groups: $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.3.3 NE收缩血管反应 BDL组较SO组在同一时间点的收缩反应明显减弱($P < 0.01$),在低浓度时BDL组间在不同时间点上比较没有统计学意义($P > 0.05$),在NE浓度大于 10^{-6} mol/L BDL3组收缩反应较BDL7、BDL14组增强($P < 0.05$)。NE浓度在 10^{-6} mol/L时收缩到最大幅度,增加浓度收缩幅度下降。SO组在不同时间点上比较无统计学差异($P > 0.05$,图2)。

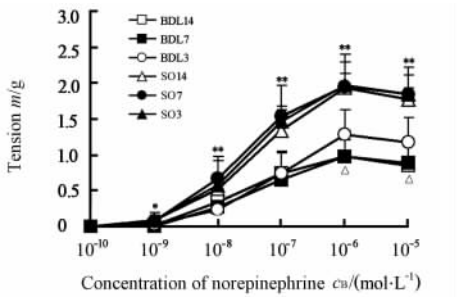


图2 大鼠胸主动脉环对去甲肾上腺素的反应
Fig 2 Response elicited by norepinephrine in rat thoracic aortic rings

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs BDL3, BDL7, or BDL14 group of same time point; $\Delta P < 0.05$ vs BDL3 group. BDL7 and BDL14 group: $n = 9, \bar{x} \pm s$; other groups: $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.3.4 硝普钠舒张血管反应 阻塞性黄疸大鼠离体

胸主动脉对硝普钠的舒张反应较SO组明显增强,但是BDL组和SO组的组内比较没有统计学差异(图3)。

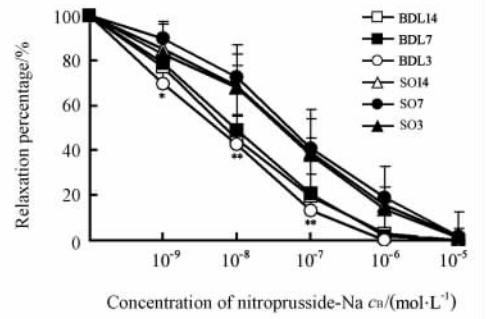


图3 大鼠胸主动脉环对硝普钠的反应
Fig 3 Response elicited by nitroprusside-Na in rat thoracic aortic rings

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SO group. BDL7 and BDL14 group: $n = 9, \bar{x} \pm s$; other groups: $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.4 细胞中 α_{1D} -AR蛋白的表达 α_{1D} -AR蛋白的表达情况比较BDL组较SO组明显减弱($P < 0.01$)。BDL3组的蛋白表达情况较BDL7组和BDL14组强($P < 0.01$)。BDL7组和BDL14组比较没有统计学差异(图4)。

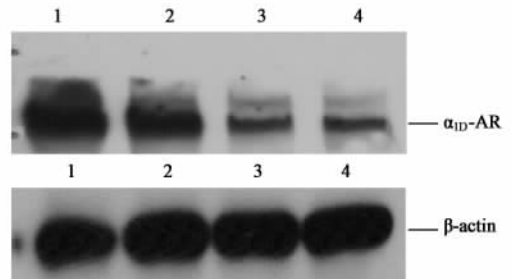


图4 α_{1D} -AR蛋白的表达情况
Fig 4 Expression of α_{1D} -AR protein

1; SO group; 2; BDL3 group; 3; BDL7 group; 4; BDL14 group

3 讨论

在本实验中,通过结扎大鼠胆总管建立阻塞性黄疸大鼠模型,在不同时间点取大鼠离体胸主动脉,检测NE、PE和SNP引起的收缩和舒张反应。实验结果显示阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉对NE、PE所引起的收缩反应明显减弱,而对SNP的舒张功能增强。在以往的研究中,Bomzon等^[4]通过对慢性胆总管结扎犬动脉内灌注NE、血管紧张素E(AE)检测血管的反应性,在术后第1周和第3周,动脉对NE、AE反应也是明显降低的,这与本实验的结果是一致的。血管功能的改变可能与阻塞性黄疸时血管内皮的损伤造成缩血管因子(EDCFs)和扩血管因子(EDRFs)比例的失调有关。血管内皮细胞是血管壁和血液之间的分界细胞,能合成和分泌释放重要的

血管活性物质,其中最主要的是内皮素-1(ET-1)和一氧化氮(NO)。ET-1通过作用于平滑肌细胞上的A型受体(ETA),经偶联的G-蛋白激活磷脂酶C而产生2个第二信使,DG和IP₃。IP₃使肌质网(SR)释放Ca²⁺增加而发挥收缩平滑肌的作用,DG则通过PKC发挥刺激平滑肌增殖的作用。NO则通过激活可溶性鸟苷酸环化酶,使cGMP增多,cGMP使胞质内[Ca²⁺]降低而引起平滑肌的舒张。但是,阻塞性黄疸时,由于内毒素和细胞因子如TNF- α 、IL-1等的增加直接损害了血管内皮,从而导致了EDCFs和EDRFs比例的失调,导致动脉血管收缩功能的变化。Chisaki等^[5]研究证实肝胆疾病患者血浆中升高的鹅脱氧胆酸可以诱导内皮细胞源性的NO的产生,Uktan等^[6]发现增加内源性NO的产生或释放与实验性阻黄所致的血管对血管收缩物质反应性降低有关,此效应与梗阻时间的长短有关。除胆盐及内源的NO对血管平滑肌产生影响外,阻黄时内毒素及一些细胞因子如白细胞介素、TNF都直接或间接影响血管平滑肌功能。内毒素的有效成分——细菌脂多糖可刺激iNOS的表达,使NO合成和释放增加^[7]。刘祥德等^[8]研究发现胆总管结扎后血浆NO含量明显升高,可达假手术组的255%,而ET含量随时间的延长呈逐渐下降趋势,至第10日、14日,分别下降32%和43%,与假手术组相比相差显著。因此,阻塞性黄疸导致的内毒素血症和高胆红素血症对动脉血管内皮细胞和平滑肌细胞功能的影响可能是血流动力学变化的原因之一。

另外,本实验通过Western印迹方法检测到阻塞性黄疸大鼠胸主动脉平滑肌细胞中 α_{1D} -AR蛋白的表达减弱,这也可能是阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉对血管活性药物反应性减低的原因之一。研究发现不同组织细胞上的 α_1 -AR的药理学特性并不均一,存在多种亚型,目前已克隆的有 α_{1A} -AR、 α_{1B} -AR、 α_{1D} -AR共3种亚型(按照国际药理联合会受体命名与药物分类委员会规定)。其中 α_{1D} -AR亚型则主要表达在大鼠主动脉和输精管及人的主动脉、大脑皮层组织^[9]。Saussy等^[10]根据 α_{1D} 的药理特性,首先提出去甲肾上腺引起的大鼠主动脉的收缩是由 α_{1D} 受体亚型所介导的。研究^[11-12]发现大鼠主动脉 α_{1D} 受体亚型主要作用是通过调节血管平滑肌的收缩影响循环阻力和动脉血压。许开明等^[13]通过采用定量液相杂交进一步分析了3种亚型在主动脉中的分布,结果显示在大鼠主动脉40 μ g总RNA的 α_{1A} 、 α_{1B} 和 α_{1D} 的mRNA含量中, α_{1D} 的mRNA所占的比例最高,约57%,而 α_{1A} 和 α_{1B} mRNA所占比例分别为

19%和24%。进一步证实大鼠主动脉以 α_{1D} 亚型为主。本实验通过检测阻塞性黄疸大鼠 α_{1D} -AR蛋白的表达证实,随着阻塞性黄疸时间的延长,大鼠 α_{1D} -AR蛋白表达减弱,这与动脉的最大收缩功能随着梗阻时间的延长而相对减弱基本一致,进一步说明 α_{1D} -AR蛋白表达下降可能是阻塞性黄疸大鼠离体胸主动脉收缩功能减弱的原因之一。

[参考文献]

- [1] Geyik M F, Aldemir M, Hosoglu S, Ayaz C, Satilmis S, Buyukbayram H, et al. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstructive jaundice[J]. Ann R Coll Surg Engl, 2006, 88: 176-180.
- [2] Inagaki T, Moschetta A, Lee Y K, Peng L, Zhao G, Downes M, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 3920-3925.
- [3] Assimakopoulos S F, Scopa C D, Zervoudakis G, Mylonas P G, Georgiou C, Nikolopoulou V, et al. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia intestinal oxidative stress and apoptosis in experimental obstructive jaundice[J]. Ann Surg, 2005, 241: 159-167.
- [4] Bomzon A, Rosenberg M, Gali D, Binah O, Mordechovitz D, Better O S, et al. Systemic hypotension and decreased pressor response in dogs with chronic bile duct ligation[J]. Hepatology, 1986, 6: 595-600.
- [5] Chisaki K, Nakajima T, Iwasawa K, Iida H, Matsumoto A, Tada M, et al. Enhancement of endothelial nitric oxide production by chenodeoxycholic acid in patients with hepatobiliary diseases[J]. Jpn Heart J, 2001, 42: 339-353.
- [6] Uktan Z N, Utkan T, Sarioglu Y, Gönüllü N N. Effects of experimental obstructive jaundice on contractile responses of dog isolated blood vessels: role of endothelium and duration of bile duct ligation [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000, 27(5-6): 339-344.
- [7] Chu C J, Lee F Y, Wang S S, Chang F Y, Lin H C, Lu R H, et al. Evidence against a role for endotoxin in the hyperdynamic circulation of rats with prehepatic portal hypertension [J]. J Hepatol, 1999, 30: 1105-1111.
- [8] 刘祥德,何振平,别平. 梗阻性黄疸大鼠血浆NO与ET改变及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22: 731.
- [9] Price D T, Lefkowitz R J, Caron M G, Berkowitz D, Schiwinn D A. Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implication for human α -adrenergic physiology[J]. Mol Pharmacol, 1994, 45: 171-175.
- [10] Saussy D L, Goetz A S, King H K, True T A. BMY7378 is selective antagonist of α_{1D} -adrenergic receptors; further evidence that vascular α_1 -adrenergic receptors are of α_{1D} -subtypes[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1994, 72(Suppl 1): 323.
- [11] Tauoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Ooshikawa S, Kawai T, et al. The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction[J]. J Clin Invest, 2002, 109: 765-775.
- [12] Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera M A, Ivorra M D, D'Ocon P. Functional characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in vascular tissues using different experimental approaches: a comparative study[J]. Br J Pharmacol, 2003, 138: 359-368.
- [13] 许开明,韩启德. 大鼠主动脉 α_1 肾上腺素受体3种亚型的mRNA水平[J]. 科学通报, 1997, 42: 1110.