

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00291

固定时间热暴露对大鼠胸主动脉血管收缩性的影响

李光华^{1*}, 赵楠¹, 杨敏¹, 赵志芳¹, 罗彦¹, Osamu Shido²

1. 宁夏医科大学基础医学院生理学系, 银川 750004
2. 岛根大学医学部环境生理教研室, 出云 693-8501

[摘要] **目的** 探讨固定时间热暴露对大鼠胸主动脉血管收缩特性的影响及机制。**方法** 选用雄性 Wistar 大鼠, 随机分为对照组、随意时间热暴露组和固定时间热暴露组, 环境温度 24℃, 热暴露温度为 36℃, 每天热暴露 6 h。经 7 d 热暴露后, 采用体温遥感技术监测大鼠体核温度变化; 器官浴槽法测定大鼠胸主动脉对去甲肾上腺素(NA)的反应性; RT-PCR检测胸主动脉血管内皮型一氧化氮合酶(*eNOS*) mRNA 的表达水平及用试剂盒测定血浆中一氧化氮等离子体(NO_x) NO_2^- 和 NO_3^- 的含量变化。**结果** 热暴露对大鼠的体核温度变化影响不大($P>0.05$); 与对照组相比, 固定时间热暴露组大鼠胸主动脉血管对 NA 的反应性降低($P<0.01$); 与对照组和随意时间热暴露组相比, 固定时间热暴露组 *eNOS* mRNA 相对表达水平及血浆中 NO_x 的含量增加($P<0.05$)。**结论** 固定时间热暴露可改变大鼠胸主动脉血管的反应性, 内皮细胞源性的 NOS 通路可能参与并诱导了血管舒张作用。

[关键词] 热; 体温; 血管收缩; 胸主动脉

[中图分类号] R 134.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)03-0291-04

Effects of heat exposure during fixed time on thoracic aorta contractility in rats

LI Guang-hua^{1*}, ZHAO Nan¹, YANG Min¹, ZHAO Zhi-fang¹, LUO Yan¹, Osamu Shido²

1. Department of Physiology, School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China
2. Department of Environmental Physiology, School of Medicine Shimane University, Izumo 693-8501, Japan

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of heat exposure during fixed time on the thoracic aorta contractile properties of rats and the related mechanism. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into control group, random-time heat exposure group and fixed-time heat exposure group (ambient temperature to 24℃; the two heat exposure groups were exposed to heat [36℃] 6 h daily). After 7 days of heat exposure, the body core temperature of rats was measured by telemetry technology. The response of isolated thoracic aorta to noradrenaline (NA) was determined by organ bath system. Expression of aorta *eNOS* mRNA and plasma NO_x (NO_2^- and NO_3^-) content were also examined. **Results** Heat exposure showed no significant effects on body core temperature of rats ($P>0.05$). Compared with control group, the fixed-time heat exposure group had significantly lowered thoracic aortic vascular reactivity to NA ($P<0.01$). Compared with control group and random-time heat exposed group, the fixed-time heat exposure group had significantly increased *eNOS* mRNA expression and plasma NO_x content ($P<0.05$). **Conclusion** Fixed-time exposure to heat can change the reactivity of the thoracic aorta in rats, and vascular endothelial cell-derived NOS pathway may be involved in the vasodilatory effects.

[Key words] heat; body temperature; vasoconstriction; thoracic aorta

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3): 291-294]

热环境可对人体的循环功能、体温调节功能以及代谢产生严重的影响, 尤其可使心血管系统负担加重, 如加速皮肤血液流动以散发热量, 致使心内血容量减小, 每搏输出量减少, 心率代偿性升高^[1]; 另外,

高热环境可使身体的体核温度(core temperature)升高, 引起疲劳, 导致机体工作能力下降, 严重时会对机体造成热损伤。如何通过简便、可行的有效方法, 减轻心血管系统的负担、降低机体疲劳发生, 是当今

[收稿日期] 2012-12-04 **[接受日期]** 2013-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金(81060230), 宁夏医科大学校级重点孵育科研项目(XZ2012005). Supported by National Natural Science Foundation of China (81060230) and Key Hatching Project of Ningxia Medical University (XZ2012005).

[作者简介] 李光华, 博士, 教授。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0951-6980121, E-mail: ghlee0404@163.com

医学领域面临的重要研究课题之一。本研究通过观察固定时间热暴露对离体大鼠胸主动脉环的影响,探讨不同热暴露模式对动脉血管的直接作用,并分析其可能的机制,为高温环境下的作业人员合理分配工作时间、降低热暴露损伤提供实验依据和理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂及仪器 30只雄性5周龄Wistar大鼠,由日本岛根大学医学部实验动物中心提供。自由饮食,光照明暗周期为12h:12h,即每天6:00~18:00为暗,18:00~次日6:00为明。大鼠分笼饲养,每笼1只;鼠笼每2~3d清理一次。鼠笼规格为44cm×27cm×19cm,环境温度(24.0±0.1)℃。

人工气候舱(ESPC,日本);苯巴比妥钠(Sigma,美国);器官浴槽(UFER537,日本);PCR试剂盒(Qiagen,德国);体温传感器(TA10TA-F40,美国);PCR扩增仪(Applied Biosystems,美国);高压液相色谱(Waters 717plus Autosampler System,美国);血浆中一氧化氮等离子体(NO_x,包括NO₂⁻和NO₃⁻)测定试剂盒(Kit 40020,Active Motif,美国)。

1.2 模型制备及分组 参照文献[2]对12只大鼠腹腔注射苯巴比妥钠(50mg/kg),大鼠麻醉后,开腹,置入体温传感器,缝合。待大鼠恢复2周后,将其随机分为对照组(control,CN)、随意时间(random time,RT)热暴露组和固定时间(fixed time,FT)热暴露组,各4只,分别测定各组大鼠体温。另18只大鼠同样分成上述3组,每组6只,用于检测大鼠胸主动脉血管反应性、内皮型一氧化氮合酶(*eNOS*) mRNA及血浆中NO_x的变化水平。环境温度为24℃,热暴露温度为36℃,相对湿度(32±4.3)%。固定时间热暴露组均于每天6:00~12:00进行热暴露,随意时间热暴露组每天任意变换热暴露时间。热暴露时间均为7d,每天6h。

1.3 观察记录大鼠体核温度 大鼠体核温度由体温传感器收集,并分别按白昼与夜晚分析处理。

1.4 测定大鼠胸主动脉血管反应性 热暴露结束后,于次日8:00麻醉大鼠,下腔静脉取血,分离血清,保存在-80℃待测。迅速取出胸主动脉,小心剔除血管周围结缔组织后,剪成3~4mm的血管环。取材过程中手法轻巧,避免过度牵拉,以防损伤内

皮。在去内皮实验中,用与血管内径相适的棉棒从管腔擦过,连续3次。将血管环悬挂于预置5mL Krebs液[成分(mmol/L):NaCl 10,KCl 4.6,CaCl₂ 2.5,NaHCO₃ 24.8,KH₂PO₄ 1.2,MgSO₄ 1.2,glucose 5.6],pH 7.4的浴槽内,37℃恒温,持续通以95%O₂和5%CO₂的混合气体。血管环加静息张力约1.6g平衡60min,期间每15min更换Krebs液一次。待血管环稳定后,加入60mmol/L KCl重复刺激3次,以诱发血管的最大收缩张力,中间更换Krebs液恢复至基础张力后,向浴槽中加入累积浓度的去甲肾上腺素(10⁻¹⁰~10⁻⁵mol/L)。以KCl引起血管环最大收缩张力,此效应为100%,测累积加入去甲肾上腺素(10⁻¹⁰~10⁻⁵mol/L)的各组血管张力,并计算占KCl诱发血管最大收缩张力的百分率(%)。

1.5 测定大鼠*eNOS* mRNA表达水平 取大鼠胸主动脉,立即置入含有RNA Later液中,-80℃保存;按照试剂盒(BIO-RAD,USA)说明书提取总RNA。行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA的完整性,紫外分光光度计检测RNA的纯度和浓度。

RT-PCR以总RNA为模板,按照试剂盒(RR037A,TaKaRa Bio Inc.,Japan)说明书反转录合成cDNA,-20℃保存。PCR扩增条件为:95℃预变性15min后,94℃15s,63℃30s,72℃30s,40个循环后,72℃延伸15min,4℃保存。其中,*eNOS*引物序列: AAC CTG CAG AAC CGC AAG/GCT TGA TGA GCA GGT CTA TGC(产物长度243bp);*βactin*引物序列: TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT/CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA GGA TG(产物长度285bp)。

eNOS mRNA相对表达水平采用2^{-ΔΔCt}法^[3]计算:ΔCt=ΔCt(目的基因)-ΔCt(内参基因);ΔΔCt=ΔCt(样本)-ΔCt(对照)。其中,目的基因为*eNOS*,内参基因为*βactin*,对照为白昼对照组。所有样本行RT-PCR,重复2次,取其平均值。

1.6 血浆中NO_x(NO₂⁻和NO₃⁻)测定 按试剂盒说明书进行操作,测定单位为μmol/L。

1.7 统计学处理 应用SPSS 11.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}±s$ 表示,两样本均数间比较采用Student's *t*检验,多样本均数间比较和去甲肾上腺素浓度-反应量效曲线之间的比较均采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 热暴露对大鼠体核温度的影响 结果显示, 对对照组和热暴露组大鼠的体核温度呈现明显的昼低夜高的节律性变化, 但对照组与热暴露组组间体核温度差异无统计学意义(图 1)。

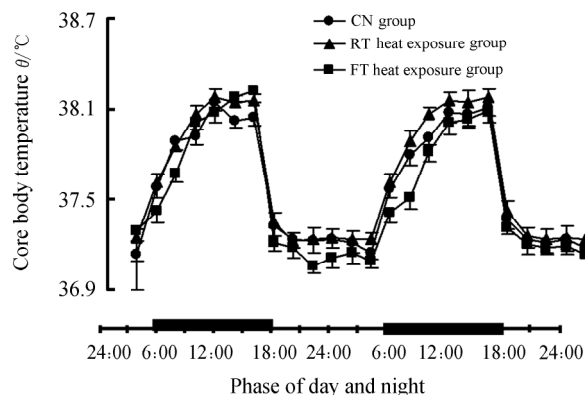


图 1 热暴露对大鼠体核温度变化的影响

Fig 1 Effects of heat exposure on body temperature of rats

CN: Control; RT: Random time; FT: Fixed time. Closed bar above the abscissa indicates the dark phase of the day. $n=4, \bar{x} \pm s$

2.2 热暴露对大鼠胸主动脉血管收缩反应性的影响 各组大鼠胸主动脉环对去甲肾上腺素的收缩反应性均呈浓度依赖性增高。与对照组比较, 固定时间热暴露组大鼠胸主动脉血管收缩反应降低 ($P < 0.01$); 其他两组间两两比较, 差异无统计学意义(图 2)。

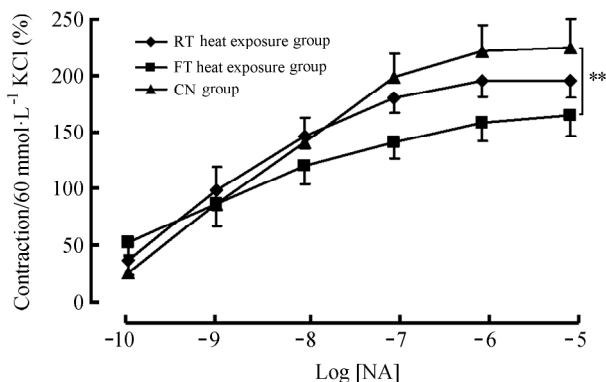


图 2 热暴露对大鼠胸主动脉血管收缩反应性的影响

Fig 2 Effects of heat exposure on thoracic aorta response to NA of rats

NA: Noradrenaline (mol/L); RT: Random time; FT: Fixed time; CN: Control. $** P < 0.01; n=6, \bar{x} \pm s$

2.3 热暴露对大鼠去内皮细胞胸主动脉血管收缩

反应性的影响 各组大鼠去内皮细胞胸主动脉血管对去甲肾上腺素的收缩反应性均呈浓度依赖性增高, 各组间两两比较, 差异均无统计学意义(图 3)。

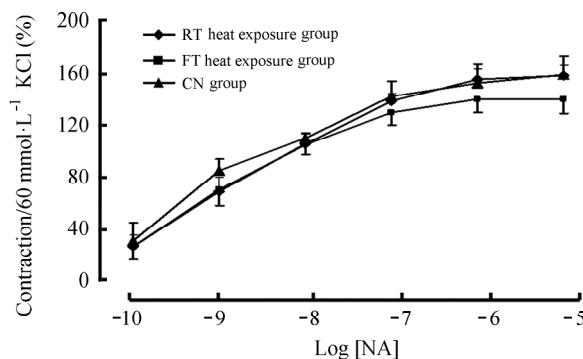


图 3 热暴露对大鼠去内皮细胞胸主动脉血管收缩反应性的影响

Fig 3 Effects of heat exposure on response of endothelium-denuded thoracic aorta to NA in rats

NA: Noradrenaline (mol/L); RT: Random time; FT: Fixed time; CN: Control. $n=6, \bar{x} \pm s$

2.4 热暴露对大鼠胸主动脉血管 eNOS mRNA 表达的影响 与对照组 (100.0 ± 12.8) 和随意时间热暴露组 (106.6 ± 15.5) 比较, 固定时间热暴露组大鼠胸主动脉血管 eNOS mRNA 表达水平 (142.7 ± 18.8) 升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。随意时间热暴露组与对照组比较, 大鼠胸主动脉血管 eNOS mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 热暴露对大鼠血浆中 NO_x 含量的影响 与对照组 [$(10.2 \pm 3.4) \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$] 和随意时间热暴露组 [$(11.8 \pm 4.5) \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$] 比较, 固定时间热暴露组大鼠血浆中 NO_x (NO_2^- 和 NO_3^-) 含量 [$(17.6 \pm 5.2) \times 10^{-3} \mu\text{mol/L}$] 升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。随意时间热暴露组与对照组比较, 大鼠血浆中 NO_x (NO_2^- 和 NO_3^-) 的含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

高热可引起心肌缺血、坏死, 促发心律失常、心功能减退或衰竭, 机体为保证内环境的适宜温度, 必须调节产热与散热过程, 并使两者维持平衡状态。恒温动物拥有非常精巧的自我平衡的自律机制, 即将体温维持在一个波动很小的范围, 这通常接近动物耐受温度的上限而远离耐受温度的下限, 虽然其所处的生活环境的气温变化很大, 但体温仍能保持

相对恒定^[4-5]。血管系统在热应激过程中发挥非常重要的作用,当机体温度升高时,心泵功能加强,大动脉(如胸主动脉)血管扩张,以便接受更多的血量,皮肤血管舒张,以加强散热。这对于细胞的正常功能的维持至关重要。

血管内皮细胞不仅是循环血液与血管平滑肌细胞间的机械屏障,而且是机体最大、最重要的一种内分泌器官。血管内皮细胞通过释放内皮细胞源性舒张因子参与调节血管平滑肌的张力。一氧化氮(NO)是内皮源性血管舒张因子之一,一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是NO合成的关键酶,目前已经确定的亚型有3种,分别称为神经元型NOS(neuronal NOS, nNOS)、诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)和内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS),它们催化L-精氨酸生成NO,然后扩散进入血管平滑肌,激活鸟苷酸环化酶,使血管平滑肌细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)水平升高,细胞内游离Ca²⁺浓度降低进而引起血管平滑肌舒张。NO的化学性质不稳定,生物半衰期极短(仅5 s),可被氧化自由基等灭活,在有氧的条件下,分解为硝酸、亚硝酸(NO₂⁻和NO₃⁻)的无机化合物^[6-8]。由于nNOS在外周组织中表达较少,我们检测了大鼠热暴露后胸主动脉血管中iNOS的表达,但因表达水平太低而无法检测到(结果中未展示),可能与热暴露的温度强度与时间长度不够有关。但本研究结果显示,固定时间热暴露可增加胸主动脉血管中eNOS mRNA的表达量,且血浆中NO_x(NO₂⁻和NO₃⁻)的含量升高,热暴露后去内皮细胞的血管对去甲肾上腺素的反应性在三组间没有明显差异。此外,本研究也测定了去甲肾上腺素诱导的血管内皮细胞释放腺嘌呤(adenosine、AMP、ADP和ATP)的含量变化,结果发现无统计学意义(结果中未展示),进一步说明内皮源性的NO可能参与了固定时间热暴露诱导的血管舒张作用。但由于本研究个别检测项目样本量不大(n=4),因此,本研究仅为初步结论,今后将进行进一步的实验论证。

值得注意的是,本研究在7 d热暴露结束后的次日取大鼠胸主动脉进行相关检测,固定时间热暴露组仍然保持较强的对抗去甲肾上腺素引起血管收缩的力量,这种力量很可能是由血管内皮细胞合成并释放NO引起的。由于随意时间热暴露组并未发生胸主动脉血管对去甲肾上腺素的反应性降低及

eNOS mRNA的表达水平升高的现象,因此,可初步判断,固定时间热暴露组的血管舒张作用升高是发生在热暴露停止后相对固定的时间段。这种有趣的现象提示,机体的血管组织本身也存在前馈现象,即对即将发生的、规律的外界刺激提前预判并作出反应。本研究结果提示,从事运动训练人员在固定时间进行运动训练有可能提高训练水平及运动成绩,从事高温作业,尤其是三班轮换制等的人员,在相对固定时间工作可能会减少热损伤的发生概率。动脉血管的“前馈反应”能维持多久及其发生的分子生物学机制还有待于进一步研究探讨。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张娟娟. 运动与热环境[J]. 当代体育科技, 2011, 1: 13-15.
- [2] Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Li G H, Hashimoto M, Shido O. Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats [J]. Pflugers Arch, 2009, 458: 661-673.
- [3] Li G H, Katakura M, Maruyama M, Enhkjargal B, Matsuzaki K, Hashimoto M, et al. Changes of noradrenaline-induced contractility and gene expression in aorta of rats acclimated to heat in two different modes[J]. Eur J Appl Physiol, 2008, 104: 29-40.
- [4] 宋高晴. 热条件下运动负荷对脑的生理功能及代谢的影响[J]. 山东体育学院学报, 2004, 20: 48-51.
- [5] 李光华, 李红, 张庆华, 刘红梅, 刘宏鹏, 紫藤治. 热应激对大鼠肝脏节律性基因 *Per2* mRNA 表达水平的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32: 215-217.
- [6] Shin C Y, Lee N I, Je H D, Kim J S, Sung J H, Kim D S, et al. Cardiovascular responses and nitric oxide production in cerebral ischemic rats[J]. Arch Pharm Res, 2002, 25: 697-703.
- [7] Oddi S, Latini L, Viscomi M T, Bisicchia E, Molinari M, Maccarrone M. Distinct regulation of nNOS and iNOS by CB2 receptor in remote delayed neurodegeneration[J]. J Mol Med (Berl), 2012, 90: 371-387.
- [8] Naseem K M. eNOS, iNOS or no NOS, that is the question! [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6: 1373-1375.

[本文编辑] 魏学丽, 邓晓群