

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00718

• 论 著 •

中枢一氧化氮对心血管作用的多样性研究

章汝文^{1,2△}, 沈 镀^{1,2△}, 孙巍巍^{3△}, 王杨凯¹, 白 洁², 袁文俊^{1,2}, 王伟忠^{1*}

1. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433
2. 宁夏医科大学基础医院院生理系, 银川 750004
3. 第二军医大学基础部计算机教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察一氧化氮(nitric oxide, NO)在心血管中枢孤束核(NTS)和头端延髓腹外侧区(RVLM)内的心血管作用特点,从而明确其在介导中枢心血管功能调控中的意义。**方法** 采用微量注射的方法观察麻醉SD大鼠NTS和RVLM增加或降低NO后动物血压、心率和肾交感神经活动的变化。**结果** 在麻醉SD大鼠模型上,在心血管反射传入的中继站NTS内微量注射NO前体L-精氨酸(L-Arg, 2 nmol/50 nl)能降低基础血压、心率和肾交感神经活动($P<0.05$),而注射NO合酶(NOS)抑制剂N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME, 10 nmol/50 nl)能增加心血管功能($P<0.05$)。在交感输出的关键区域RVLM注射L-Arg (2 nmol/100 nl)能增加血压、心率和交感神经活动($P<0.05$),而给予L-NAME (10 nmol/100 nl)则抑制心血管功能($P<0.05$)。**结论** NO在不同的心血管中枢中具有不同的作用,提示其多样性效应对维持基础心血管功能具有特定的意义。

[关键词] 一氧化氮;孤束核;头端延髓腹外侧区;血压

[中图分类号] R 331.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)07-0718-03

Multi-effect of central nitric oxide on cardiovascular activity

ZHANG Ru-wen^{1,2△}, SHEN Du^{1,2△}, SUN Wei-wei^{3△}, WANG Yang-kai¹, BAI Jie², YUAN Wen-jun^{1,2}, WANG Wei-zhong^{1*}

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Physiology, Basic Medical School, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China
3. Department of Computer, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of nitric oxide(NO)on cardiovascular activities in the nucleus tractus solitarius (NTS) and the rostral ventrolateral medulla (RVLM), so as to understand the role of central NO in cardiovascular regulation. **Methods** The changes of blood pressure (BP), heart rate (HR), and renal sympathetic nerve activity (RSNA) were observed following treatments with increased or decreased NO in the NTS and RVLM of anaesthetized SD rats. **Results** Microinjection of the NO precursor L-arginine (L-Arg, 2 nmol in 50 nl) into the NTS, a key relay of cardiovascular reflex transmission, produced significant decreases in BP, HR, and RSNA ($P<0.05$), and injection of NO synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME, 10 nmol in 50 nl) into the NTS produced significant increases in these cardiovascular parameters ($P<0.05$). However, injection of L-Arg (2 nmol in 100 nl) into the RVLM, a key region controlling sympathetic outflow, significantly increased basal BP, HR, and RSNA ($P<0.05$), and injection of L-NAME (10 nmol in 100 nl) into the RVLM showed a cardiovascular inhibition effect ($P<0.05$). **Conclusion** NO exhibits different effects in different cardiovascular centers, suggesting that it plays a special role in maintaining the basal cardiovascular activity.

[Key words] nitric oxide; nucleus tractus solitarii; rostral ventrolateral medulla; blood pressure

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(7): 718-720]

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种作用非常广泛的气体分子,其在NO合酶(NO synthase, NOS)催化L-精氨酸(L-arginine, L-Arg)过程中释放并发挥多种生物学效应,在外周的心血管功能调控中具有重要的

[收稿日期] 2012-04-19 **[接受日期]** 2012-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金(30971061, 31100831), 第二军医大学青年启动基金(2010QN03). Supported by National Natural Science Foundation of China (30971061, 31100831) and the Starting Foundation for Young Scholars of Second Military Medical University (2010QN03).

[作者简介] 章汝文, 硕士生. E-mail: xixi_steven@yahoo.com.cn; 沈 镀, 硕士生. E-mail: shenduya@163.com; 孙巍巍, 讲师. E-mail: sun_wei_wei@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870982, E-mail: wangwz68@hotmail.com

意义,其生成的异常与心血管疾病的发生发展关系密切^[1]。中枢神经系统也存在生成 NO 的 NOS 表达,已证实 NO 具有影响其他神经递质释放的作用^[2]。

血压(blood pressure, BP)等心血管功能的调控与中枢神经系统密切相关。孤束核(nucleus tractus solitarius, NTS)是心血管反射传入中枢的第一站,其神经元的功能活动参与基础 BP 等心血管功能的调节。头端延髓腹外侧区(rostral ventrolateral medulla, RVLM)不仅接受来自 NTS 等其他心血管中枢的传入,同时其神经元通过脊髓投射支配外周的交感神经活动,从而调节心血管功能^[3]。在 NTS 和 RVLM 内均存在生成 NO 的 NOS 表达,这两个区域中 NO 可能参与心血管功能的调控^[4-5]。本研究通过观察 NO 在 NTS 和 RVLM 内的心血管作用特点,分析它们在介导中枢心血管功能调节中的可能意义。

1 材料和方法

1.1 动物 体质量为 250~300 g 的雄性成年 SD 大鼠购自第二军医大学实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(沪)-2002-0041,生产许可证号:SCXK(沪)-2004-0003。

1.2 一般手术操作 具体步骤参照本课题组的前期研究^[6-7]。用 3%戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔注射诱导麻醉,气管插管后人工通气,呼出气体中 CO₂ 的浓度通过 CO₂ 检测仪控制在 4%~5%。右侧股动脉和股静脉插管,动脉导管连接至液压换能器后再接至 Power Lab/8sp 电生理记录仪(ADInstruments,澳大利亚)监测动脉及心率(heart rate, HR)变化。静脉插管用于静脉补液、补充复合麻醉氨基甲酸乙酯和肌肉松弛剂三碘季铵酚。将大鼠头部固定于立体定位仪上,通过去除枕骨和部分小脑后暴露延髓背侧。暴露左侧肾脏,显微镜下运用玻璃分针分离肾神经,接双极记录电极,用 Wacker silgel 932 硅胶覆盖神经和电极。用前置放大器将肾交感神经活动(renal sympathetic nerve activity, RSNA)信号放大 1 000 倍(通过频率 100~3 000 Hz),并通过示波器监测,RSNA 信号经 Power Lab/8sp 系统进行记录和幅度整合,采样速度为每秒 2 000 次。整合 RSNA(integrated RSNA, inte-RSNA)在处理前统一设定为 100%。大鼠腹下垫体温控底板,并以一次性尿不湿分隔以免烫伤。温度探头插入大鼠直肠,距肛门约 1 cm,肛温维持在 37℃。

1.3 核团微量注射 NTS 和 RVLM 的定位通过标准图谱^[8]来确定。通过自制的三管电极进行微量注射,分别灌入相应的药物,NTS 和 RVLM 内的注射体积分别为 50 nl 和 100 nl,注射时间为 5~10 s。

注射药物 L-谷氨酸(L-Glu)、No 前体 L-Arg 和 NOS 抑制制 N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)均购自 Sigma 公司,溶于人工脑脊液(aCSF)。aCSF 作为溶剂对照。通过注射 L-Glu(1 nmol)到 NTS 和 RVLM 分别引起的降压与升压作用进行这两个核团功能的定位,30 min 后再进行正式的研究。在每次注射前 10 min 和注射后 60 min 监测大鼠的 BP(以平均动脉压表示)、HR 和 RSNA 变化并将记录存盘。

1.4 统计学处理 应用 S Stat 3.5 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。注射前后数据比较采用配对 *t* 检验,各组间比较采用单因素的方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 NTS 内微量注射 L-Arg 和 L-NAME 对心血管功能的作用 15 只大鼠分为 3 组($n=5$): aCSF 对照组、L-Arg 组、L-NAME 组,组间基础 BP 和 HR 差异无统计学意义(表 1)。单侧 NTS 微量注射 L-Arg(2 nmol)后 1 min 内出现 BP[(67.21±2.1) mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa]、HR [(330.9±5.2)次/min]和 inte-RSNA[(57.9±5.9)%]的下降($P<0.05$),持续时间不超过 5 min,后迅速恢复至注射前水平。而注射 L-NAME(10 nmol)后导致大鼠 BP[(114.9±2.8) mmHg]、HR [(435.7±5.7)次/min]和 inte-RSNA [(138.9±5.1)%]上升($P<0.05$),持续时间超过 30 min。NTS 内注射不同药物导致的 BP、HR 和 inte-RSNA 的变化值见图 1。

表 1 不同实验组大鼠的基础血压和心率

Tab 1 Baseline blood pressure and heart rate in different groups

| Group | Mean arterial pressure p/mmHg | Heart rate f/min ⁻¹ |
|----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| $n=5, \bar{x} \pm s$ | | |
| NTS injection | | |
| aCSF | 99±3 | 398±13 |
| L-Arg | 95±4 | 409±14 |
| L-NAME | 96±5 | 389±14 |
| RVLM injection | | |
| aCSF | 102±4 | 412±15 |
| L-Arg | 98±5 | 386±14 |
| L-NAME | 97±4 | 391±13 |

1 mmHg=0.133 kPa. NTS: Nucleus tractus solitarius; RVLM: Rostral ventrolateral medulla; aCSF: Artificial cerebrospinal fluid; L-Arg: L-arginine; L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester

2.2 RVLM 内微量注射 L-Arg 和 L-NAME 对心血管功能的作用 15 只大鼠分为 3 组($n=5$): aCSF 对照组、L-Arg 组、L-NAME 组,组间基础 BP 和 HR 差

异无统计学意义(表1)。与NTS的结果正好相反,单侧RVLM微量注射L-Arg(2 nmol)后3 min内出现BP[(125.6±1.9) mmHg]、HR[(444.3±6.8)次/min]和inte-RSNA[(137.1±3.2)%]的增加($P < 0.05$),持续时间不超过10 min,后迅速恢复至注射前

水平;而注射L-NAME后导致大鼠BP[(68.1±4.1) mmHg]、HR[(339.3±5.5)次/min]和inte-RSNA[(70.7±3.8)%]下降($P < 0.05$),持续时间超过30 min。RVLM内注射不同药物导致的BP、HR和inte-RSNA的变化值见图1。

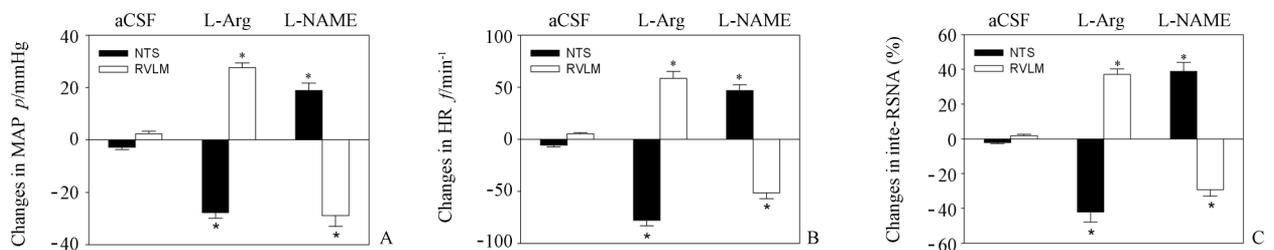


图1 NTS和RVLM内微量注射L-Arg和L-NAME导致的血压(A)、心率(B)和inte-RSNA(C)最大变化值

Fig 1 Maximal changes in MAP(A), HR(B), and inte-RSNA(C) induced by microinjection of L-Arg and L-NAME into the NTS or RVLM. MAP: Mean arterial pressure; HR: Heart rate; inte-RSNA: Integrated renal sympathetic nerve activity; L-Arg: L-arginine; aCSF: Artificial cerebrospinal fluid; L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester; NTS: Nucleus tractus solitarii; RVLM: Rostral ventrolateral medulla. 1 mmHg=0.133 kPa. * $P < 0.05$ vs aCSF; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

研究证实NO可同时刺激兴奋性(如谷氨酸)和抑制性[如γ-氨基丁酸(GABA)]神经递质的释放^[9-10]。有趣的是,在心血管中枢中,各研究组的结论不完全相同,如RVLM内注射NO供体硝普钠后可引起升压或降压的不同效应^[11-12]。本研究的结果显示在不同心血管中枢NTS和RVLM内,NO具有相反的心血管作用,即NTS内NO具有降低心血管功能的作用,而RVLM内NO则产生兴奋心血管功能的作用,提示NO可能在不同区域刺激不同性质神经递质的释放,从而导致心血管效应的多样性。本研究通过注射L-NAME抑制内源性NO后产生了相反的作用,提示内源性NO对维持基础心血管功能具有重要意义。NTS可以通过尾端延髓腹外侧区GABA能投射抑制RVLM神经元活动^[3],推测NO可能具有兴奋神经元的作用。正如注射兴奋性氨基酸L-Glu到NTS导致的降压作用,实际上是兴奋了NTS神经元活动导致尾端延髓腹外侧区投射到RVLM内GABA的释放增加,抑制了RVLM神经元活动从而出现BP降低等心血管抑制效应。而在RVLM内,NO直接兴奋其心血管神经元活动导致外周的交感神经活动增强,血管收缩和心肌收缩力增强,进而产生心血管兴奋效应。

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] Umar S, van der L A. Nitric oxide and nitric oxide synthase iso-

forms in the normal, hypertrophic, and failing heart[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 333(1-2):191-201.

[2] Garthwaite J, Boulton C L. Nitric oxide signaling in the central nervous system[J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57:683-706.

[3] Guyenet P G. The sympathetic control of blood pressure[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7:335-346.

[4] Lin H C, Wan F J, Cheng K K, Tseng C J. Nitric oxide signaling pathway mediates the L-arginine-induced cardiovascular effects in the nucleus tractus solitarii of rats[J]. Life Sci, 1999, 65:2439-2451.

[5] Chang A Y, Chan J Y, Chan S H. Differential distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rostral ventrolateral medulla of the rat[J]. J Biomed Sci, 2003, 10:285-291.

[6] Peng J F, Wu Z T, Wang Y K, Yuan W J, Ni X, Sun D T, et al. GABAergic mechanism in the rostral ventrolateral medulla contributes to the hypotension of moxonidine[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89:473-481.

[7] Wang W Z, Wang L G, Gao L, Wang W. Contribution of AMPA/kainate receptors in the rostral ventrolateral medulla to the hypotensive and sympathoinhibitory effects of clonidine[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293:R1232-R1238.

[8] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 3rd ed. New York: Academic Press, 1998.

[9] Matsuo I, Hirooka Y, Hironaga K, Eshima K, Shigematsu H, Shihara M, et al. Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia *in vivo*[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 280:R1285-R1291.

[10] Chan S H, Wang L L, Chan J Y. Differential engagements of glutamate and GABA receptors in cardiovascular actions of endogenous nNOS or iNOS at rostral ventrolateral medulla of rats[J]. Br J Pharmacol, 2003, 138:584-593.

[11] Talman W T. NO and central cardiovascular control: a simple molecule with a complex story[J]. Hypertension, 2006, 48:552-554.

[12] Tseng C J, Liu H Y, Lin H C, Ger L P, Tung C S, Yen M H. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats[J]. Hypertension, 1996, 27:36-42.