

内皮素 A 受体拮抗剂 BQ123 对肉仔鸡股动脉压和肺动脉压的影响

王慧煜 乔健 高铭宇 杨鹰 利凯 欧德渊 王建琳 田勇

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 为探讨内源性内皮素-1(ET-1)是否参与肉鸡血压的维持等生理调节活动,采用急慢性给予内皮素 ET_A 受体的特异性拮抗剂 BQ123,研究内源性 ET-1 对正常肉鸡股动脉压和肺动脉压的影响。结果表明: 1) 豁免法检测 2~6 周龄正常肉仔鸡血浆(从 40.82 ± 1.90 升高到 93.70 ± 11.19 pg/mL)和肺匀浆内皮素(从 503.84 ± 27.40 升高到 701.04 ± 16.18 pg/g)的含量随日龄的增加有升高的趋势; 2) 急性翼静脉注射 BQ123(0.4 和 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)能够极显著降低肉鸡的股动脉收缩压、舒张压和肺动脉收缩压、舒张压($P < 0.01$),注射 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ BQ123 压力下降低程度比注射 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 大,肺动脉压达到最低点的时间比股动脉早; 3) 慢性给予 BQ123 能够使肉鸡肺动脉收缩压极显著下降(对照组 3.37 ± 0.47 kPa, BQ123 组 2.46 ± 0.50 kPa, $P < 0.01$),股动脉收缩压显著下降(对照组 20.95 ± 1.17 kPa, BQ123 组 18.85 ± 2.05 kPa, $P < 0.05$)。试验结果显示: 急性和慢性注射 ET_A 受体的特异性拮抗剂 BQ123 都能降低肉鸡股动脉压和肺动脉压,推测内源性 ET-1 参与了肉鸡血压的维持等生理调节活动。

关键词 BQ123; 内皮素-1; 内皮素 A 受体拮抗剂; 股动脉压; 肺动脉压; 肉仔鸡

中图分类号 S 852.33

文章编号 1007-4333(2007)03-0056-05

文献标识码 A

Effects of endothelin on femoral artery and pulmonary artery pressures in broiler chickens

Wang Huiyu, Qiao Jian, Gao Mingyu, Yang Ying, Li Kai, Ou Deyuan, Wang Jianlin, Tian Yong

(Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Endothelin-1 (ET-1) is an important factor in the regulation of cardiovascular tone in humans and mammals, but its biological function in the avian vascular system has not been studied. The purpose of this study is to characterize the role of endogenous ET-1 in the vascular system of poultry by investigating the effect of endothelin [a receptor (ET_A R) antagonist BQ123] on femoral artery pressure (FAP) and pulmonary artery pressure (PAP) in broiler chickens. First, we found that plasma and lung homogenate ET-1 levels were both increased with age over seven weeks' life cycle of broiler chickens. Second, 60 min after intravenous injection of BQ123 (0.4 and $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectively) there was a significant reduction in FAP and PAP ($P < 0.05$). Third, continuous infusion of BQ123 ($2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ each time, two times a day) into abdominal cavities led to a significant decrease in the femoral artery systolic pressure ($P < 0.05$) and pulmonary artery systolic pressure ($P < 0.01$) at 7 and 14 days after treatment. In summary, the ET_A R antagonist BQ123 led to a significant reduction in FAP and PAP in broiler chickens, suggesting that endogenous ET-1 may be involved in the maintenance and regulation of systemic and pulmonary pressure in broiler chickens.

Key words BQ123; ET-1; endothelin A receptor antagonist; the femoral artery pressure; the pulmonary artery pressure; broiler chickens

血管内皮对于维持心血管正常状态有着重要作用^[1]。在内皮细胞分泌的各种生物活性物质中,内皮素是目前研究比较多的一种。内皮素具有 3 种亚型(ET-1、ET-2、ET-3)的肽类激素家族,其生物学

效应是通过 2 种主要的内皮素受体 ET_A 和 ET_B 介导的。 ET_A 受体主要分布于血管平滑肌细胞,介导 ET-1 的收缩血管和促有丝分裂效应,而 ET_B 受体主要分布于血管内皮,介导血管舒张效应^[2]。各种

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070567)

作者简介: 王慧煜,博士研究生, E-mail: maoyi78@163.com; 乔健,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事禽类心血管系统病理生理学研究, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

动物包括禽类和哺乳动物内皮素A类受体之间是高度保守的,即禽类完整cET_A受体序列与哺乳动物的ET_A受体序列是高度一致的^[3]。在鸡心内膜至少有2种不同类型的内皮素受体共存^[4]。Kempf等还克隆、排序和表达了鸡ET_A受体,并且表明,这种受体与内皮素拮抗剂的亲和力与其相应的哺乳动物的对应物表现出来的亲和力非常相似。以肺动脉高压和右心肥大为主要特征的肉鸡腹水综合征(ascites syndrome, AS),也称肺动脉高压综合征(PHS),在病理生理学特征方面与人类和哺乳动物的肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)非常相似^[5]。最近的研究表明,ET-1在AS中有着重要作用^[6]。

以往的研究证实,内源性ET-1能维持包括人在内的哺乳动物的正常血管生理状态和血压^[7],但其对禽类血压的调节作用还不清楚;因此,本试验采用急慢性给予ET_A受体的特异性拮抗剂BQ123研究内源性ET-1对正常肉鸡股动脉压和肺动脉压的影响,从而探讨内源性ET-1是否参与肉鸡血压的维持等生理调节活动,为进一步研究以肺动脉高压为中心环节的肉鸡腹水综合征的发病机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

BQ123(购自 Peninsula Lab Inc. USA),融解在0.3 mg/mL 二甲基亚砷(DMSO, 购自 Sigma)后保存在-30℃备用;Endothelin RIA Kit,购自 Peninsula Lab Inc. USA;MP150型生物信号采集系统由BIOPAC Systems Inc. CA, USA生产;聚乙烯动脉插管购自中国医学科学院基础所生理室;常规外科手术器械。

1.2 试验动物

1日龄商品代AA雄性肉鸡(购自北京华都肉鸡公司),在通风良好、光照充足、密度适宜的条件下饲养,自由采食和饮水。0~15日龄饲喂肉仔鸡全价配合颗粒饲料(购自北京大发正大饲料公司),16~49日龄饲喂肉仔鸡配合颗粒饲料(购自北京大发正大饲料公司)。饲养过程中进行常规免疫。

1.3 试验方法与步骤

1.3.1 内皮素测定 肉仔鸡翅静脉采血2 mL,注入预冷的含30 μL 10 mg/mL EDTA·Na₂和40 μL抑肽酶的试管中,混匀,4℃,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,-80℃保存备用。压力测定后,快速处死肉鸡,迅速取出肺组织,称重(一般取300~400

mg),尽快放入生理盐水1 mL 碾磨制成匀浆,4℃,3 000 r/min离心15 min,取上清液,-80℃保存备用。采用放免法测定上述血浆和肺匀浆内皮素的含量。

1.3.2 股动脉压与肺动脉压的测定 在本试验中,股动脉压和肺动脉压分别表示体循环和肺循环。采用改良的右心导管法和股动脉插针法测量肺动脉压和股动脉压。将试验鸡逐只称重后仰卧保定在手术台上,用5 mg/mL 盐酸普鲁卡因在其右侧颈中部和左侧股动脉附近作局部浸润麻醉。切开皮肤,分离皮下结缔组织,游离右侧颈静脉1 cm左右,结扎远心端,在近心端剪一小口,将充满3.8 mg/mL 柠檬酸钠溶液的聚乙烯动脉导管沿向心方向缓缓推进,经前腔静脉、右心房、右心室到达肺动脉,将压力信号由压力传感器传输给MP150型生物信号采集系统显示压力波形,并记录压力值;同时分离股动脉1 cm左右,结扎远心端,在近心端剪口,将接有聚乙烯塑料软管的平头针头直接插入股动脉中,用生物信号采集系统记录其压力值。

试验过程中压力传感器和肉鸡的心脏要始终保持同一水平。试验前试验鸡禁食一夜,只供饮水。

1.3.3 试验步骤 本试验为了确定急性经翼静脉给予不同剂量内皮素受体拮抗剂后,肉鸡股动脉压和肺动脉压是否有变化及其变化情况。26~28日龄正常鸡经翼静脉分别注射含0.1 mg/mL DMSO的生理盐水、0.4和2.0 μg/kg BQ123。观察注射前10 min至注射后60 min之间股动脉收缩压(FASP)、舒张压(FADP)和肺动脉收缩压(PASP)、舒张压(PADP)的变化情况。经过长期调控,为检测腹腔给予内皮素受体拮抗2周内,肉鸡股动脉压和肺动脉压的变化情况,16日龄开始,试验组肉鸡每天早晚2次腹腔注射2.0 μg/kg BQ123;对照组肉鸡每天2次腹腔注射含0.1 mg/mL DMSO的生理盐水。分别在给药后7和14 d测定肺动脉压和股动脉压。

1.4 数据处理

结果用平均数±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,数据用SPSS软件的独立样本one-way-ANOVA统计,并进行Duncan检验。

2 结果

2.1 血浆与肺匀浆内皮素含量的变化

正常肉仔鸡血浆和肺匀浆内皮素的含量随日龄的增加而升高,并且血浆内皮素含量远远低于肺匀

浆的含量(表1)。

急性翼静脉注射 0.4 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BQ123 60 min 后,血浆和肺匀浆中内皮素的含量都没有显著变化 ($P > 0.05$),但是,如表 1 所示,慢性腹腔注射

2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BQ123 后,23 和 30 日龄血浆内皮素的含量有所下降 ($P > 0.05$),肺匀浆内皮素的含量在 23 和 30 日龄时显著下降 ($P < 0.05$)。肺匀浆内皮素含量大大高于血浆内皮素的含量 ($P < 0.01$)。

表 1 慢性腹腔注射 BQ123 后肉仔鸡血浆和肺匀浆内皮素-1 含量的变化

Table 1 Broiler plasma and lung homogenate endothelin-1 (ET-1) levels after chronic intraperitoneal administration of BQ123

内皮素含量	组别	日龄/d				
		15	22	29	36	43
血浆内皮素质量浓度/(pg/mL)	对照组	40.82 \pm 1.90	46.07 \pm 8.21	52.92 \pm 5.36	72.78 \pm 3.85	93.70 \pm 11.19
	BQ123 组		42.82 \pm 1.90	49.73 \pm 4.98		
肺匀浆内皮素质量比/(pg/g)	对照组	503.84 \pm 27.40	567.20 \pm 52.55	609.56 \pm 29.26	676.58 \pm 28.44	701.04 \pm 16.18
	BQ123 组		495.84 \pm 52.55 *	531.36 \pm 27.06 *		

注: * $P < 0.05$,与对照组相比差异显著; $n = 10$ 。

2.2 静脉注射 BQ123 对肉鸡股动脉压和肺动脉压的影响

从图 1 和 2 可以看出,静脉注射 BQ123 (0.4 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 引起 FASP、FADP、PASP 和 PADP 显著下降 ($P < 0.05$),FASP 和 FADP 在 30 min 达到最

低值,60 min 后恢复到起点。在同一时间点高剂量的 BQ123 (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 引起的压力下降大于低剂量的 BQ123 (0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。PASP 和 PADP 的变化趋势与 FASP 和 FADP 相似,不同的是,PASP 和 PADP 在静脉注射 BQ123 20 min 时达到最低点。

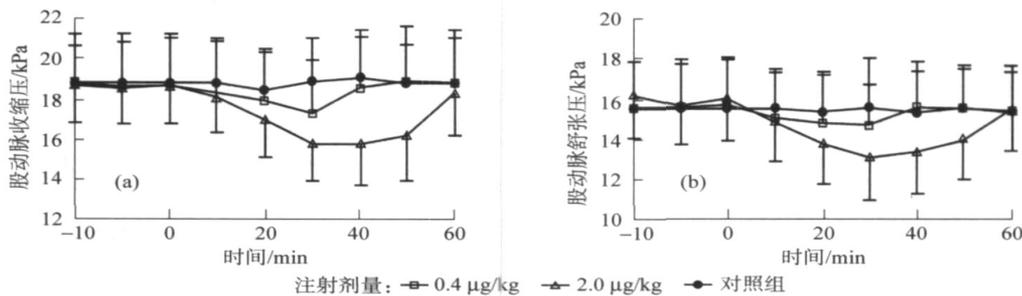


图 1 急性静脉注射不同剂量 BQ123 对肉鸡股动脉压的影响 ($n = 10$,下同)

Fig. 1 Effects of intravenous infusion of BQ123 on FASP (a) and FADP (b)

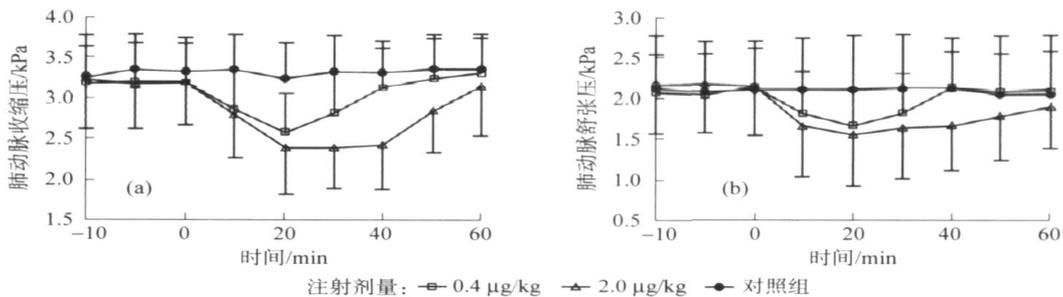


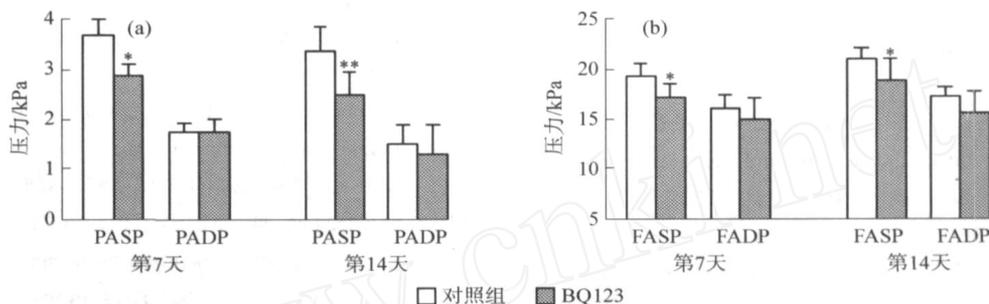
图 2 急性静脉注射不同剂量 BQ123 对肺动脉压的影响

Fig. 2 Effects of intravenous infusion of BQ123 on PASP (a) and PADP (b)

2.3 连续注射 BQ123 对肉鸡股动脉压和肺动脉压的影响

从图 3 可以看出,与同日龄对照组相比,注射

BQ123(2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 7 和 14 d 以后 FASP($P < 0.05$) 和 PASP($P < 0.01$) 都显著下降,而 FADP 和 PADP 没有显著变化($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$, 与对照组相比差异显著; ** $P < 0.01$, 与对照组相比差异极显著。PASP 为肺动脉收缩压, PADP 为肺动脉舒张压, FASP 为股动脉收缩压, FADP 为股动脉舒张压

图 3 慢性腹腔注射 BQ123 对肺动脉压 (a) 和股动脉压 (b) 的影响

Fig. 3 Effects of chronic administration of BQ123 on pulmonary artery pressure (a) and femoral artery pressure (b)

3 讨论

1) ET-1 是通过自分泌和旁分泌作用的局部激素,不是循环激素,所以血浆中的 ET-1 水平比较低,远低于肺组织 ET-1^[8]。本试验结果也证实了这点,肺匀浆内皮素含量远远大于血浆中含量,并且血浆和肺匀浆内皮素的含量随日龄的增加而升高。这与周东海^[9]等人报道的结果相似。本试验结果显示肺匀浆 ET-1 水平远远高于血浆 ET-1 的水平,这可能暗示在肉仔鸡中肺是 ET-1 发挥生物学效应的重要靶器官。

2) 许多研究表明,内源性 ET-1 在维持哺乳动物血管活性和血压方面起着重要的作用^[10]。ET-1 的血管收缩作用是通过 ET_A 受体介导的^[11],BQ123 通过阻断 ET 与 ET_A 受体的相互作用,抑制 ET 对血管平滑肌的收缩作用。BQ123 (-D-Asp-L-Pro-D-Val-L-Leu-D-Trp-),是目前药理学和分子生物学研究中最常见的 ET_AR 阻断剂,竞争性地拮抗 ET-1 的缩血管和升压效应。它能降低正常血压大鼠^[12] 10% 的血压,给健康志愿者臂动脉输入 BQ123 能引起前臂血管进行性舒张,能显著地抑制 ET-1 所致的健康人皮下微血管收缩^[13]。BQ123 还能拮抗 ET-1 介导的犬肺动脉的收缩^[14]。在以往的研究中 BQ123 用来间接研究内源性 ET-1 的作用,所以本试验也采用 2 种方式利用 BQ123 间接探讨内源性 ET-1 在肉鸡血管系统方面的作用机制:翼静脉注射 BQ123 可以观察到 FAP 和 PAP 的瞬时变化,直接反映 BQ123 对内源性 ET-1 的拮抗作用。试验结

果显示,翼静脉注射不同剂量的 BQ123 60 min 没有引起血浆和肺匀浆中内皮素含量的显著变化,但是 2 种剂量的 BQ123 都能够使肉鸡 FASP 和 FADP、PASP 和 PADP 下降,并且 BQ123 剂量越大,压力下降程度越大,恢复所需的时间越长;然而,肺动脉收缩压和舒张压达到最低点的时间比股动脉收缩压和舒张压早一些。相似的结果在 BQ123 对人和其他哺乳动物影响的研究中也能得到。Bigaud 等报道麻醉鼠静脉给予 BQ123 后能引起股动脉压下降,并伴随着全身血管舒张^[15]。连续 2 周腹腔注射 BQ123 可以观察到肉鸡经过一段时间对 BQ123 的适应后股动脉压和肺动脉压的变化情况。从结果可以看出,连续注射 BQ123 后 7 和 14 d 能使正常肉鸡 FASP 和 PASP 显著下降,并且 PAP 的变化比 FAP 明显(肺动脉收缩压的最大降低幅度为 21.80%,股动脉收缩压的最大降低幅度为 11.04%)。

有研究表明,一些因素通过破坏血管收缩和舒张、增殖和抗增殖之间的平衡而造成血管内皮的紊乱,从而引起和/或加重肺动脉高压。ET-1 通过 ET_AR 参与肺动脉高压的病理过程。在哺乳动物的研究中,ET-1 受体拮抗剂不仅能降低肺动脉高压,而且能抑制肺动脉重塑和右心肥大的症状。本试验结果可为进一步研究内皮素系统和肉鸡肺动脉高压综合征之间的关系提供基础数据,并为研究与肉鸡肺动脉高压综合征病理生理学特征相似的人和其他哺乳动物肺动脉高压之间的关系提供借鉴。

总之,无论急性和慢性给予 BQ123 均能降低肉仔鸡股动脉压和肺动脉压,并且对肺动脉压的影响

较大,提示内源性 ET-1 可能通过 ET_A 受体的作用参与肉仔鸡血压维持的生理调节。

参 考 文 献

- [1] Takahashi T, Kanda T, Inoue M, et al. Endothelin converting enzyme inhibitor protects development of right ventricular overload and medial thickening of pulmonary arteries in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension[J]. *Life Sci*, 1998, 63(10): 137-143
- [2] Sudjarwo S, Hori M, Tanaka T, et al. Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating venous smooth muscle contraction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 200: 627-633
- [3] Kempf H, Linares C, Corvol P, et al. Pharmacological inactivation of the endothelin type A receptor in the early chick embryo: a model of mispatterning of the branchial arch derivatives[J]. *Development*, 1998, 125: 4931-4941
- [4] Watanabe H, Miyazaki H, Kondoh M, et al. Two distinct type of endothelin receptors are present on chick cardiac membranes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161(3): 1252-1259
- [5] 杨鹰, 乔健. 内皮素受体拮抗剂 BQ123 及内皮素抗体对蛋用鸡肺血流动力学的影响[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(5): 9-11
- [6] Yang Ying, Qiao Jian, Wu Zhenlong, et al. Endothelin-1 receptor antagonist BQ123 prevents pulmonary artery hypertension induced by low ambient temperature in broilers[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 2201-2205
- [7] Haynes W G, Webb D J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone [J]. *Lancet*, 1994, 344(8926): 852-854
- [8] 杨鹰, 乔健, 孙茂红, 等. 内皮素-1 对蛋鸡股动脉压和肺动脉压的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2003, 8(1): 103-105
- [9] 周东海, 郭定宗, 杨世锦, 等. 内皮素对肺动脉高压综合征肉鸡的影响[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(6): 912-916
- [10] Haynes W G, Webb D J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone [J]. *Lancet*, 1994, 344(8926): 852-854
- [11] Yanagisawa M, Masaki T. Endothelin, a novel endothelium-derived peptide, Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 38: 1877-1883
- [12] Bazil M K, Lappe R W, Webb R L. Pharmacologic characterization of an endothelin A (ET_A) receptor antagonist in conscious rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, 20: 940-948
- [13] Wenzel R R, Ruthemann J, Bruck H, et al. Endothelin-A receptor antagonist inhibits angiotensin and noradrenaline in man[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52(2): 151-157
- [14] Robert N W, Eliot H O, Marcus P M, et al. Nonpeptide endothelin receptor antagonists: Attenuation of acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the dog[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 250(2): 695-701
- [15] Bigaud M, Pelron J T. Discrimination between ET_A- and ET_B-receptor-mediated effects of endothelin-1 and [Ala^{1,3,11,15}] endothelin-1 by BQ123 in the anaesthetized rat [J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 207: 1912-1918