

· 基础研究 ·

运动训练对大鼠心肌内皮素含量及受体分型的影响

孙泊 庄涛

【摘要】目的 探讨运动训练对大鼠心肌组织内皮素-1 (ET-1) 含量、ET 受体分型及受体特征的影响。方法 选用健康雄性 SD 大鼠进行跑台运动训练,采用放射免疫法测定大鼠心肌 ET-1 含量,采用放射性配基结合受体分析法测定心肌组织 ETAR 及 ETBR 的变化情况。结果 大鼠经运动训练后,其心肌细胞膜的 ET-1 含量下降 ($P < 0.01$),心肌细胞膜 ETAR 最大结合量降低 ($P < 0.05$),解离常数 K_d 值无显著改变;ETBR 的最大结合容量升高 ($P < 0.01$),解离常数 K_d 值显著降低 ($P < 0.01$)。结论 运动训练主要通过调节 ET 不同亚型受体的比例、亲和力及结合容量,从而对 ET-1 的生成、清除及与受体的结合能力产生影响,使 ET 的作用效力发生改变,从而增强心脏的调节功能。

【关键词】运动训练; 内皮素-1; 内皮素受体; 心肌

The effect of sports training on endothelin-1 and endothelin-1 receptor and its subtypes in the myocardium

SUN Bo, ZHUANG Tao. Physical Education of Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

【Abstract】Objective To explore the effects of sports training on endothelin-1 (ET-1) and endothelin-1 receptor (ETR) and its subtypes in the myocardium in rats. Methods After sports training, levels of endothelin-1 were measured using radioimmunoassay, and changes in ETAR and ETBR levels by radioligand binding assay. Results The endothelin-1 level in myocardial cells was significantly reduced ($P < 0.01$) in the trained group, the maximal binding capacity (B_{max}) of ETAR was reduced ($P < 0.05$), the dissociation constant (KD) was unchanged, the B_{max} of ETBR increased ($P < 0.01$), and its KD was reduced ($P < 0.01$). Conclusion Sports training can change the proportion of different subtypes and activity of ETR in the myocardium, and change the rate of generation and elimination of ET-1 and its ability to combine with its receptors. This influences the effect of ET-1, and improves the regulation of the heart during exercise.

【Key words】Sports training; Endothelin-1; Endothelin receptor; Myocardium

内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 是 1988 年由日本 Yanagisawa 等^[1]首先从猪主动脉内皮细胞中分离纯化出的一种由 21 个氨基酸组成的活性多肽类物质,具有强烈的收缩血管及刺激血管平滑肌细胞增生的作用;后续研究发现,心肌细胞内也有 ET-1 分布,其细胞膜上有 ET-1 受体 (endothelin receptor, ETR) 存在。这些局部组织的 ET-1 以旁分泌、自分泌的方式调节心血管局部紧张度,并对心肌营养代谢及内分泌功能具有重要影响^[2]。近年来随着医学领域对 ET-1 的不断深入研究,它在各类心血管疾病中的作用越来越受到重视。已知 ET-1 是通过 ET-1 受体来实现对机体的各种作用,但迄今为止涉及运动训练对心肌 ET-1 受体特征型影响的研究报道较少,对于在运动条件下心肌组织的 ET-1 受体分型变化尚不清楚。本实验在建立长期运动训练模型的基础上,对运动训练后动物模型心肌组织的 ET-1 含量、受体分型及受体特征性变化进行探讨,以进一步了解运动对心脏 ET-1 的影响机制,为科

学制定运动训练方案、预防心血管系统损伤及心血管疾病康复提供理论及实验依据。现报道如下。

材料与方法

一、实验动物与分组

共选取健康 2 月龄雄性 SD 大鼠 40 只 (由维通利华实验动物技术有限责任公司提供),体重为 180 ~ 220 g,经适应性喂养 1 周后随机分为对照组及运动训练组,每组 20 只。2 组大鼠均以国家标准啮齿类动物饲料喂养 8 周,期间大鼠自由饮水、摄食,室温保持在 20 ~ 22℃,相对湿度为 45% ~ 50%,光照时间为 12 h/d。对照组常规饲养,不加任何干预;运动训练组大鼠则在电动鼠类跑台上进行递增负荷运动,运动负荷参照 Bedford 训练模型标准^[3],初始运动强度为 15 m/min × 15 min,以后每隔 2 d 增加 2 m/min × 5 min,最终运动强度为 29 m/min × 50 min,每周训练 6 d,共训练 8 周。在建模期间每日观察大鼠的一般状态、饮食量及体重等,以监控建模过程。

二、标本取材及制备

对照组与运动训练组大鼠于最后一次运动结束 24 h 后取材。首先将大鼠用乙醚麻醉后解剖,取 200 mg 心室肌组织并将其切碎,放置于 1 ml 0.5 N 预冷的乙酸中,然后在沸水浴中煮沸 10 min,立即置入冰水中,随后进行匀浆处理;接着在 4℃ 环境下离心 15 min (3 000 转/min),取上清液置于 -20℃ 环境中保存待测 ET-1,测定前先进行蛋白定量,将数据单位转换成 pg/mg pro。另取部分心肌组织切碎后,置入预先配置的缓冲液 1 (pH 值为 7.5, 20 mmol/L Tris, 250 mmol/L Sucrose, 5 mmol/L MgCl₂) 中匀浆,然后在 4℃ 环境下离心 10 min (900 转/min),取上清液;再于 4℃ 环境下离心 10 min (43 000 转/min),取沉淀物将其悬浮于缓冲液 2 (含 600 mM KCl 的缓冲液 1) 中并置于冰上 10 min;然后再一次于 4℃ 环境下离心 20 min (43 000 转/min),最后冲洗 2 次,所得成分即为心肌质膜,于 -70℃ 条件下保存待测 ETR,测定前进行蛋白定量,将蛋白浓度调整至 0.8 mg/ml。

三、实验试剂与仪器

本研究中的放射免疫分析试剂盒购于北京北免东雅生物技术研究所,¹²⁵I-ET-1 由北京原子能研究院标记,比活度为 2 000 Ci/mmol,放射化学纯度为 98%; ET-1、BQ788 购于 Merck 公司;滤膜为进口 GF-C 玻纤膜;低温离心机为 GL20A 型全自动高速冷冻离心机 (由湘西仪表仪器总厂机械仪器分厂生产)。

四、实验测定方法

1. ET-1 的测定:严格按照放射免疫分析试剂盒的要求进行,最后用 γ 计数器进行计数测定。

2. ETR 的测定:设置双复管,每管加膜蛋白 100 μg 和不同浓度的放射性配基 ¹²⁵I-ET-1 (10 ~ 60 pmol/L),与其平行的非特异性结合管则加入 1 000 倍放射性配基浓度的未标记 ET-1。竞争性结合分析中所用的 ¹²⁵I-ET-1 浓度为 50 pmol/L, ET-1 浓度为 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L, BQ778 浓度分别为 300, 100, 30, 10, 3 及 1 μmol/L,反应体积为 0.5 ml。上述各管均在 30℃ 环境下孵育 30 min,用细胞收集仪和玻璃纤维滤纸过滤未结合的 ¹²⁵I-ET-1,滤纸经洗涤后进行 γ 计数,反应管中未加 ET-1 者为总结合量,加 ET-1 及 BQ788 者为非特异性结合。其中总结合与加 ET-1 的非特异结合之间计算出的特异结合经 Scatchard 作图,求得的 B_{max} 代表 ETAR、ETBR 之和,而总结合与加 BQ788 的非特异性结合经上述处理所得的 B_{max} 则为 ETAR。实验中受体的亲和力以解离常数 K_d 表示,受体的数量用最大结合容量 B_{max} 表示。

五、统计学分析

本研所得数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,选用 SPSS 11.5 版统计分析软件进行比较,2 组间均数比

较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠心肌细胞 ET-1 含量变化比较

本研究结果表明,对照组大鼠心肌细胞 ET-1 含量为 (53.62 ± 3.25) pg/mg pro,而运动训练组大鼠心肌细胞 ET-1 含量为 (45.34 ± 6.17) pg/mg pro,较对照组大约下降了 8.9%,两组间比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

二、各组大鼠心肌组织 ETAR 与 ETBR 变化情况比较

2 组大鼠心肌组织 ETAR 与 ETBR 的变化情况详见表 1,从表中数据可以看出,2 组大鼠心肌细胞膜上 ETAR 与 ETBR 的最大结合容量 B_{max} 有所不同,运动训练组心肌细胞膜上的 ETAR 最大结合量较对照组降低约 20%,其间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);至于运动训练组 ETAR 的解离常数 K_d 值,虽较对照组有所下降,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而运动训练组心肌细胞膜上 ETBR 的最大结合容量较对照组升高约 16% ($P < 0.01$),解离常数 K_d 值较对照组约下降 39% ($P < 0.01$),其间差异均具有统计学意义,提示运动训练组大鼠经运动后其 ETAR 数目减少,ETBR 数目增加,亲和力增强。

表 1 各组大鼠心肌组织 ETAR 与 ETBR 的 B_{max} 及 K_d 值变化比较 ($n = 20, \bar{x} \pm s$)

组 别	心肌细胞中 ETAR		心肌细胞中 ETBR	
	B _{max}	K _d	B _{max}	K _d
	(fmol/mg pro)	(pmol/L)	(fmol/mg pro)	(pmol/L)
运动训练组	$83.64 \pm 23.12^*$	169.46 ± 21.07	$58.65 \pm 16.78^{\#}$	$143.22 \pm 29.52^{\#}$
对照组	104.37 ± 18.98	180.97 ± 28.62	50.06 ± 13.72	235.03 ± 22.21

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

讨 论

一、运动训练对大鼠心肌细胞 ET-1 含量的影响

内皮素作为由内皮细胞合成、分泌的生物活性肽,是迄今所知功能最强的缩血管物质之一。在生理状态下心血管系统合成 ET-1 的量很少,主要以旁分泌、自分泌及胞内分泌的方式发挥其生理作用。然而近年来相关医学研究发现,许多心血管疾病的发生、发展与心肌内 ET-1 的分泌失调有关。有研究发现,充血性心力衰竭动物模型及患者体内的心肌 ET-1 水平均升高,提示 ET-1 可引起活体动物或离体心脏、心肌组织的血液动力学改变及循环阻力增加,对充血性心力衰竭的进程有直接促进作用^[4];同样动脉粥样硬化患者的 ET-1 水平也可见明显升高。ET-1 作为单核细胞的趋化因子,在动脉粥样硬化初始阶段具有重要作用,同时还可以刺激血管平滑肌细胞迁移、增生,加快动脉粥样硬化进程^[5]。

有研究表明,直接将 ET-1 注入动物模型的冠脉循环系统内,可减少 90% 以上的冠脉血流量,心肌缺血可以促进大鼠心肌细胞释放 ET-1,引起心肌梗死并发生心功能不全及心律失常等^[6,7]。对于上述疾病,目前国内、外许多学者发现运动康复训练能延长患者的寿命及降低死亡率,认为适当的运动训练不但可预防缺血性心脏病,同时也是心肌梗死、原发性高血压及充血性心力衰竭等心血管疾病的重要治疗措施之一,但其中具体的康复机制、运动强度等细节还有待进一步研究。本实验对大鼠采用中等强度运动进行训练,发现大鼠经运动训练后其心肌细胞 ET-1 含量较对照组明显减少,说明机体经长期中等强度运动后其心肌能产生自我保护和矫正的适宜性调节功能,从而起到预防由于病理性 ET-1 过高所引发的冠脉供血、供氧不良以及心肌、血管细胞损伤等,运动治疗机制可能还包括促进心钠素、脑钠素、降钙素基因相关肽、内皮素衍生舒张因子等的分泌,其中心钠素可能发挥主要作用。许多研究发现,内皮素能刺激心钠素的释放,而心钠素又可抑制内皮素的生物活性,即心钠素与 ET 呈负反馈调节作用。机体经长时间运动后,其心血管内分泌调节肽 ET 及心钠素相互作用,调节各自的合成与分泌水平,并在新的水平上达到平衡,从而调节心脏组织结构、功能。这样经过长期科学的运动训练后,可明显增强血管内皮功能,使机体内皮素和心钠素等心血管调节因子的合成、分泌更加协调,加强了交感神经内分泌系统的血管舒张功能,这对于临床防治心肌缺血、降低血压具有重要意义。

二、运动训练对心肌细胞膜 ET-1 受体及其分型的影响

现已知 ETR 共分为 3 型(包括 ETAR、ETBR 及 ETCR),其中 ETAR 受体主要位于血管平滑肌细胞内,ETBR 受体主要位于血管内皮细胞内,ETCR 受体仅存在于非哺乳动物体内,如大鼠心脏各部位均以 ETAR 占主要优势(ETAR > ETBR)。在通常情况下,ETAR 主要介导缩血管效应,而 ETBR 则主要介导血管舒张效应,一般认为 ET-1 引起的净效应取决于 ETAR 与 ETBR 效应间的比例^[8],因此心肌内皮素受体的变化对生理及病理状况下的心血管系统功能具有重要影响。目前在基础医学领域中关于 ETR 的研究比较多,如刘凡等^[9]发现,在不伴有心衰、肾衰及脑血管意外的原发性高血压患者中,其血浆 ET-1 水平升高多不明显,但血管对 ET-1 的反应性增加,其 ETAR 基因表达增强,因此 ETAR 数量增加可能是原发性高血压患者血管高反应性的一个重要原因。另有研究报道称,冠心病患者其动脉粥样硬化部位的 ET-1R 密度明显增加,约为正常人群的 2 倍,且其动脉粥样硬化周围的新生血管也可见同样现象,提示 ET-1R 与原发性高血压、冠心病等心血管疾病的发生、

发展具有密切联系^[10]。然而目前关于运动训练对动物心肌 ET-1 受体亚型特性的影响鲜见报道,本实验通过给予大鼠运动功能训练,发现大鼠心肌细胞内 ETAR 的最大结合容量(即数量)较对照组明显下调,分析这种现象可能是由于机体为清除运动初期体内循环系统中升高的 ET-1 而导致的自身调节反应。已有研究发现,当 ET-1 生成增多时,可以出现配基下调受体现象,认为与受体的“内趋化”有关,此种下调可以避免运动应激引起的持续性内皮素增高对机体的过度刺激。在实验中发现,随着 ETAR 下降的同时,运动训练组大鼠心肌细胞内 ETBR 数目明显增多,且亲和力增强。已知 ETBR 是 G 蛋白复合受体,当它与 ET-1 结合后,可激活 NO 合成酶,使内皮细胞产生及释放 NO,这些小分子量的 NO 可扩散至附近的血管平滑肌细胞内;通过激活鸟苷酸环化酶,使细胞内 cGMP 含量增加,进而松弛血管平滑肌,导致血压下降,因此运动训练后 ETBR 的这种变化很可能与适量有氧运动能使正常人群或轻度高血压患者血压降低具有一定的相关性;另外机体循环系统中主要依靠 ETBR 清除 ET-1 及调控 ET 转换酶,如运动训练组大鼠的 ET-1BR 数量增多、亲和力增强,则有利于清除机体组织中过多的 ET-1,防止组织中的 ET-1 水平过高、作用过于持久,并且 ET-1 经 ETBR 作用后可抑制 ET-1 转换酶 mRNA 的表达,实现 ET-1 对 ET 转换酶的反馈性调节,从而减少 ET-1 的含量,因此,在心肌细胞中,ET-1 含量的减少可能是 ETBR 上调的结果。由此看来,适量负荷的运动训练能维持机体 ETAR 与 ETBR 比例处于某一稳定的水平,对抑制心肌组织 ET-1 分泌及释放、改善心脏冠脉循环、预防心肌缺氧及防治冠状动脉痉挛、心肌梗死、高血压等均有重要的临床意义,为疾病康复治疗提供了一种非药物治疗途径。

综上所述,大鼠经过运动训练后其心肌细胞膜 ET-1 含量下降,且心肌细胞膜上 ETAR 的最大结合量降低($P < 0.05$),ETBR 的最大结合容量升高($P < 0.01$),解离常数 Kd 值下降($P < 0.01$),表明适量运动训练对大鼠心血管功能具有显著影响,不仅能降低 ET-1 水平,而且还能调节其不同受体亚型的比例、亲和力及结合容量等,从根本上调节机体 ET-1 的生成、清除及与受体的结合能力,进而对心血管系统发挥治疗作用。

参 考 文 献

- 1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1998, 332:411-415.
- 2 汤健,魏英杰. 心血管活性物质与心血管疾病. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997. 194.
- 3 Bedford M. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol*, 1979, 47:1278-1283.

- 4 MacCarthy PA, Grocott-Mason R, Prendergast BD, et al. Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and fail human heart. studies with an intracoronary ETA receptor antagonists. Circulation, 2000, 101: 142-147.
- 5 Miki S, Takeda K, Kiyama M, et al. Modulation of endothelin-1 coronary vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats by the nitric oxide system. J Am Hypertens, 2000, 13: 83-87.
- 6 Zhao H, Joshua IG, Porter JP. Microvascular response to endothelin in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rat. J Am Hypertens, 2000, 13: 819-826.
- 7 Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists.

Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. Circulation, 2004, 102: 2434-2440.

- 8 陈建康, 邹万忠, 由江峰. 内皮素基因在大鼠不同器官中的表达. 北京医科大学学报, 1996, 28: 262-264.
- 9 刘凡, 王秉臣, 王凤飞. 内皮素的调控与冠心病. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1998, 18: 20.
- 10 胡静, 温进坤. 内皮素受体反义寡聚核苷酸对内皮素受体基因表达及血管平滑肌细胞增殖的影响. 生物化学杂志, 1996, 12: 157-159.

(修回日期: 2006-05-20)

(本文编辑: 易 浩)

· 短篇论著 ·

腰椎旁阻滞治疗腰椎间盘突出症疗效观察

高玉杰

腰椎间盘突出症为临床常见疾病, 非手术治疗对大多数本病患者疗效确切。我科随机选择 130 例腰椎间盘突出症患者, 分别用腰椎旁阻滞和硬膜外腔阻滞治疗, 并对其效果进行比较, 现报道如下。

一、资料和方法

1. 一般资料: 130 例腰椎间盘突出症患者均根据其临床症状、体征及 CT 或 MRI 检查结果确诊为腰椎间盘突出症。其中男 70 例, 女 60 例; 年龄为 23 ~ 68 岁; 均排除脑血管病、糖尿病及周围神经病。将 130 例患者分为腰椎旁阻滞组 (72 例) 与硬膜外阻滞组 (58 例)。

2. 治疗方法: 腰椎旁阻滞组患者俯卧位, 常规消毒铺巾并局部麻醉, 以 8 cm 长的 7 号腰穿针, 于突出的椎间隙相对应的棘突间隙上缘、向患侧旁开 1.5 ~ 2.5 cm 处垂直进针, 触及椎板后稍退针, 并向外移动约 0.5 cm, 再进针, 当触及椎板外缘后紧贴椎板外缘进针约 1.5 cm, 有穿过椎旁韧带的突破感时, 停止进针, 并回抽无血液或脑脊液后, 注入复合药液 (2% 利多卡因 3 ml、去炎松 A 40 mg、维生素 B₁₂ 1.0 mg, 混合后以注射用水稀释至 15 ml); 硬膜外阻滞组采用常规的后正中入路硬膜外腔穿刺法, 确认无误后方可注药, 药物及剂量同腰椎旁阻滞组。穿刺到位后, 一次性注入, 5 d 后评定治疗效果。

3. 疗效标准: 优——疼痛消失, 无运动功能受限, 直腿抬高试验 > 70°; 良——疼痛明显减轻, 直腿抬高试验 45° ~ 70°; 差——症状及体征均无改善。优良者为有效。

4. 统计学分析: 2 组间数据结果经 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

腰椎旁阻滞组 72 例, 总有效 68 例, 有效率为 94.4%; 硬膜外阻滞组 58 例, 总有效 56 例, 有效率为 96.6%, 2 组有效率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

三、讨论

在腰椎间盘突出性变基础上, 如椎间盘纤维环破裂, 突出的髓核组织可压迫脊神经根, 同时髓核组织又可作为一种化学

炎症介质刺激神经组织产生无菌性炎症, 故消除炎症、减轻局部水肿才能够缓解症状。

表 1 2 组治疗效果比较

组 别	例数	优 (例)	良 (例)	差 (例)	有效率 (%)
腰椎旁阻滞组	72	40	28	4	94.4 *
硬膜外阻滞组	58	31	25	2	96.6

注: 与硬膜外阻滞组比较, * $P > 0.05$

腰椎旁间隙主要由脊椎及其周围的肌肉组成, 其前为腰大肌, 后为横突和骶棘肌, 外侧为腰方肌, 内侧为椎间孔并与之相通^[1]。腰部的脊神经从椎间孔穿出后, 神经根位于相应的椎间孔内。本研究观察到经椎旁注射复合药液后, 多数病例阻滞同侧同节段脊神经, 有 15 例阻滞同侧腰部 2 ~ 3 个节段脊神经^[2]; 而硬膜外阻滞组均发生双侧的腰部 3 ~ 6 个节段脊神经广泛阻滞。虽然 2 组的疗效结果差异无统计学意义, 但经椎旁注射药物时, 药物主要聚积在椎旁间隙和椎间孔附近, 可直接达到并集中于炎症病灶周围, 且极少向硬膜外腔广泛扩散, 从而更集中有效地消除炎症。硬膜外阻滞组中, 药物易流向疏松的非炎症组织, 且炎症部位因组织充血、水肿或增生形成, 药物扩散时不易达到病灶而影响疗效。

综上所述, 我们认为应用腰椎旁阻滞治疗腰椎间盘突出症具以下优点: ①操作简单、创伤小; ②安全性强, 椎旁阻滞多半阻滞单侧腰段脊神经且范围小, 对患者血流动力学影响小, 同时避免了椎管内血肿、脓肿等严重并发症; ③疗效迅速可靠, 因此, 该方法应是目前疼痛门诊和基层医院治疗腰椎间盘突出症时可选择的有效方法之一。

参 考 文 献

- 1 李仲廉, 郑宝森, 王子千, 主编. 神经阻滞学——100 种神经阻滞术图解. 郑州: 郑州大学出版社, 2001. 233.
- 2 付建峰, 倪家骧, 宋子贤, 等. 腰椎旁经椎间孔硬膜外腔注射治疗腰椎间盘突出症的研究. 中国疼痛医学杂志, 1998, 4: 148.

(修回日期: 2006-06-19)

(本文编辑: 松 明)