

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2016)02-0103-05

中枢 N-型钙离子通道对应激性高血压大鼠去甲肾上腺素释放的影响

吴军同¹, 巩万坤¹, 夏兆俊¹, 王峰², 黄宏平¹, 汪萌芽¹

(皖南医学院 1. 生理与神经生物学教研室; 2. 法医学院, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 研究 N-型电压门控性钙离子通道影响高血压大鼠的血压以及蓝斑投射到下丘脑去甲肾上腺素释放动力学的机制。方法: 将 24 只雄性 SD 大鼠(180~200 g) 随机分为对照组和模型组, 模型组大鼠用噪声和足底电击刺激大鼠血压升高, 在建立慢性应激性高血压大鼠模型的基础上, 电刺激蓝斑核, 运用碳纤维电极检测技术测定大鼠下丘脑内去甲肾上腺素(NE)的释放量, 进一步观察给予电压门控性钙离子通道阻断剂对 NE 的刺激-分泌量和在体血压的影响。结果: 与对照组相比, 高血压模型组大鼠血压升高($P < 0.05$), 电刺激蓝斑核, 下丘脑检测到的去甲肾上腺素的释放信号幅度增大($P < 0.05$)。侧脑室给予 N-型钙离子通道阻断剂使模型组大鼠的血压下降($P < 0.05$), 去甲肾上腺素的释放信号幅度减少($P < 0.05$)。结论: 中枢部位的电压门控 N-型钙离子通道参与应激性高血压大鼠下丘脑去甲肾上腺素的释放和血压的调控。

【关键词】中枢 N-型钙离子通道; 蓝斑; 应激性高血压; 安培法; 去甲肾上腺素

【中图分类号】R 544.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.02.001

Effects of central N-type calcium channels on noradrenaline release from locus coeruleus projecting to hypothalamus in stress induced hypertension rats

WU Juntong, GONG Wankun, XIA Zhaojun, WANG Feng, HUANG Hongping, WANG Mengya

Department of Physiology and Neurobiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the dynamic characteristics of norepinephrine (NE) release in hypothalamus followed by electrical stimulation in locus coeruleus in the rat model of stress-induced hypertension (SIH) and investigate the role of central N-type calcium channel in the pathogenesis of SIH.

Methods: 24 Male Sprague-Dawley rats (180-200 g) were randomly divided into control and SIH group. The SIH model rats were induced by both noise and foot-shock stresses. After modeling, NE release in the hypothalamus by electrical stimulation in locus coeruleus was determined and NE signal was recorded by carbon fiber electrode. **Results:** Blood pressure and the peak value of NE signal in the hypothalamus following electrical stimulation in locus coeruleus were elevated and higher in SIH rats than the controls ($P < 0.05$). Intracerebroventricular administration of ralfinamide mesylate (sodium and N-type calcium channels blocker, i. c. v. 10 μg) led to inhibited NE release in the hypothalamus in SIH rats and lowered blood pressure ($P < 0.05$), whereas weak effect of ralfinamide mesylate was seen in the control rats. **Conclusion:** Combined noise and foot-shock stresses may increase secretion of NE in the hypothalamus followed by electrical stimulation in locus coeruleus in rats. Central N-type calcium channel contributes to NE release in hypothalamus and blood pressure modulation in SIH rats.

【Key words】 central N-type calcium channel; locus coeruleus; stress induced hypertension; amperometry; noradrenaline

高血压发病主要是由遗传和环境因素引起,多数研究者认为尽管遗传因素对高血压的发生发展起主要作用,而慢性压力和心理应激等环境因素则影响最终的血压水平^[1-4]。研究表明单胺类神经递质(NE、AD、5-HT)的水平紊乱与高血压的发病有密切的关系^[5-6]。钙离子通道是降压药作用的靶标之

—^[7-8]。根据电学及药理学性质,目前认为机体内电压门控性钙离子通道(voltage-gated calcium channels, VGCCs)主要分为 5 型:T、L、N、P/Q 和 R 型。T 和 L 型钙离子通道广泛存在于兴奋或非兴奋细胞,但 N 和 P/Q 型钙离子通道则主要存在于神经元,可以影响中枢神经系统神经递质的释放。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(NSFC 30770674); 安徽省第四批优秀青年基金项目(08040106817); 皖南医学院博士启动基金项目(201206)

收稿日期: 2015-10-09

作者简介: 吴军同(1990-),男,2013 级硕士研究生,(电话)15212234086,(电子信箱)964717852@qq.com;

黄宏平,女,教授,硕士生导师,博士,(电子信箱)huanghp@wnmc.edu.cn,通讯作者。

蓝斑核位于脑桥被盖,拥有大量的 NE 能神经元,是脑中合成 NE 的主要部位。蓝斑核在中枢神经系统内的投射很广泛,包括大脑皮质、丘脑、下丘脑、小脑、杏仁核、海马、脊髓和端脑基底部等。蓝斑核不仅在应激的适应性反应等方面起着重要的调节作用,还直接和间接参与血压的调控^[9]。研究表明蓝斑神经元的 VGCs 主要为 L、N、P 型^[10]。由于电压门控型钙离子通道参与中枢神经递质的分泌,高血压发病中,蓝斑递质分泌的变化可能受到电压门控型钙离子通道功能变化的影响,并与 VGCs 的主要亚型 L、N 型有关。但是脑室给予 N 型电压门控性钙离子通道如何影响蓝斑投射到下丘脑区去甲肾上腺素的释放并未见报道。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 24 只成年雄性清洁级 SD 大鼠,体质量 180 ~ 200 g,购自南京江宁青龙山动物繁殖中心,许可证号: SCXK(苏) 2009-0002。

1.2 血压和心率的检测 血压和心率通过 ALC-NIBP 无创血压测量分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司)检测。在造模前和造模结束后对两组大鼠的体质量、血压和心率进行检测。ALC-NIBP 系统能够记录到动物的收缩压、平均压、舒张压和心率。造模前后血压检测时间都是当日相同的时间,测定环境安静,避免动物紧张导致血压升高而影响测量结果。室温保持在 26℃ 左右,通过 ALC-HTP 动物恒温系统维持动物体温,每只大鼠一次测量可得到 5 个数据,去除最大值和最小值,取平均值后保存数据。

1.3 高血压大鼠模型建立 新购大鼠进行适应性饲养 1 周,期间每天 19:00 开始进行血压测量操作,将第 7 天测得血压、心率数据保存,作为应激前血压。按体质量随机原则将大鼠分为对照组(12 只)和模型组(12 只),两组大鼠分笼饲养,自由取食。造模开始后,将模型组大鼠放置于自制的电击箱中,电击箱电压可调,有 40 V、60 V、80 V 三档,从 40 V 开始电击,第 1 周刺激强度为空载电压 40 V,将 60 s 分为 3 个 20 s,根据随机数字表随机选取 20 以内数据作为刺激发生时间,在电击前约 0.5 s 给予一个由蜂鸣器发出 100 分贝的噪声,每次电击前一定给予噪声,以期形成噪声电击复合应激。这样 1 min 内随机刺激 3 次,每次刺激 1 min,每隔 10 min 刺激 1 次。第 2 周空载电压 60 V,每次刺激 30 min,间隔 10 min 刺激 1 次。第 3 周空载电压 80 V,持续刺激 2 h,为增加造模成功率第 3 周刺激频率可以根据实

时血压结果适当增加,有时仅给予噪声刺激,以减少躯体伤害,易化心理应激。每天电击两次,每次 2 h,每天的两次电击之间间隔 4 h 以上,一般情况下应激时间为 8:00 ~ 10:00,14:00 ~ 16:00。在造模的前 1 天、第 5 天、第 10 天、第 15 天和第 20 天,两组大鼠分别在清醒状态下,于全天应激刺激停止 2 h 后(一般约 19:00),使用 ALC-NIBP 无创血压测量系统尾套法测量大鼠尾动脉血压、心率。测定的时间点尽量相同。造模前后血压升高的差值不小于 20 mmHg,且与对照组有统计学差异,视为造模成功,否则舍弃。

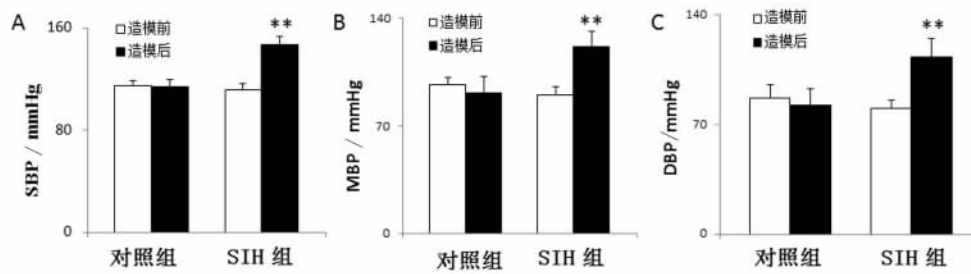
1.4 大鼠的 NE 信号检测^[12] 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(5 ~ 6 mL/kg,天津市光复精细化工研究所)进行麻醉。将大鼠固定于立体定位仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)上,使大鼠前囟 Bregma 点和人字缝 Lambda 点处于同一水平面。参照 de Groot 大鼠脑立体定向图谱和 RB4ATLAS 图谱,大鼠蓝斑核定位坐标为: A - 10 mm、L ± 1.4 mm、V - 7.5 mm; 下丘脑为: A - 1.5 mm、L ± 0.4 mm、V - 8.5 mm; 侧脑室为: A - 1.2 mm、L ± 1.8 mm、V - 4 mm。脑内刺激电极采用自制的同芯双极不锈钢针式电极,裸露尖端直径约 1mm。电刺激蓝斑核参数: 1.5 mA、20 Hz、10 pulses,每 10 min 电刺激 1 次。在下丘脑记录 NE 分泌信号,记录电极为自制的玻璃碳纤维电极,内置环氧树脂和饱和 KCl 溶液,碳纤维直径在 5 μm 左右,裸露部分长度在 100 μm 内。在大鼠颈下肌肉插入 Ag/AgCl 参考电极后,经膜片钳放大器和 UDA1 数据控制与采集器(华中科大仪博生命科学仪器有限公司)采集到 NE 信号后,分析 NE 信号的峰值、达峰时间和半衰期。峰值表示 NE 信号的幅度最大值,用来判断 NE 释放量的多少;达峰时间表示从开始电刺激 LC 到 NE 信号达峰时的时间,用来判断 NE 释放的潜伏期;半衰期表示 NE 信号从峰值到下降到峰值的 50% 的时间间隔,用来观察 NE 代谢消除的动力学过程。检测到 3 次以上的稳定信号后,分别对两组大鼠进行侧脑室注射 ralfinamide mesylate (i. c. v. 10 μg, Sigma) 30 min 后再次检测 NE 信号。检测完成后,大鼠断头取脑切片确定定位是否准确。

1.5 统计分析方法 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析采用 Microsoft Excel 工作表的数据分析工具。两组间的比较采用两独立样本 *t* 检验,同组用药前后数据的比较采用配对 *t* 检验。检验结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 噪声结合足底应激对大鼠血压的影响 造模前和造模结束后,通过 ALC-NIBP 无创血压测量分析系统对大鼠收缩压(SBP)、平均动脉压(MBP)、舒张压(DBP)和心率(HR)各检测1次。造模前,两组大鼠血压和心率差异无统计学意义。造模后,模型组大鼠 SBP 升高(146.8 ± 6.6) mmHg vs (113.7 ±

6.6) mmHg $n = 12$ $t = 12.32$ $P < 0.01$,平均动脉压(MBP)升高(121.2 ± 10.0) mmHg vs (91.1 ± 11.8) mmHg $n = 12$ $t = 6.72$ $P < 0.01$,舒张压(DBP)升高(113.6 ± 11.0) mmHg vs (81.9 ± 11.7) mmHg $n = 12$ $t = 6.70$ $P < 0.01$,心率(HR)变化差异无统计学意义(见图1)。说明噪声结合足底电击应激可以制作稳定的应激性高血压动物模型。

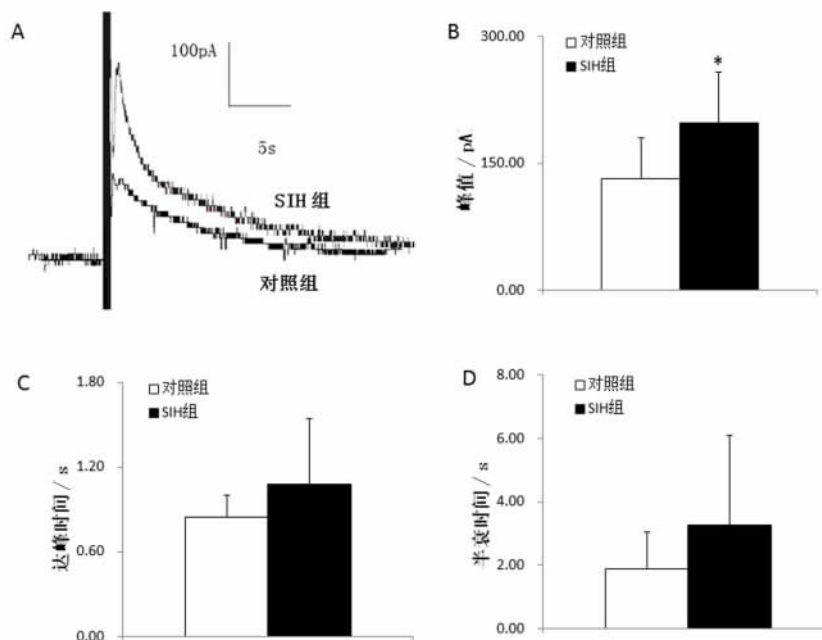


A - C. SIH 组大鼠 SBP、MBP、DBP 造模后增加; ** $P < 0.01$ SIH 组大鼠造模前后比较。

图1 20 d 噪声结合足底应激对大鼠血压的影响

2.2 电刺激蓝斑后在下丘脑检测 NE 分泌信号的比较 与对照组大鼠比较,应激性高血压模型组大鼠 NE 释放的峰值增加(201.1 ± 53.2) pA $n = 10$ vs

(145.0 ± 35.8) pA $n = 6$ $t = 2.275$ $P < 0.05$,达峰时间与半衰期差异无统计学意义(见图2)。

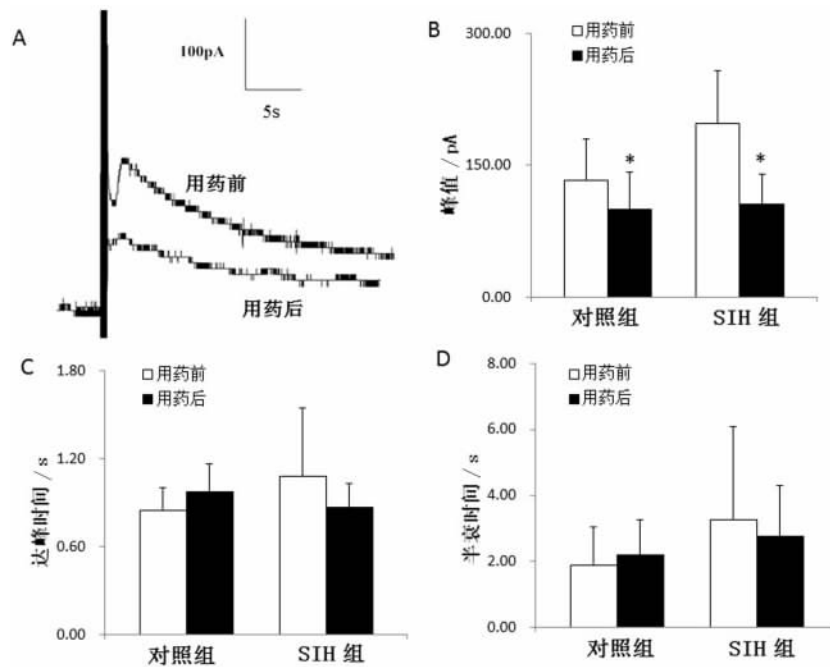


A. 典型记录的两组大鼠下丘脑 NE 分泌信号; B. SIH 组大鼠下丘脑 NE 分泌信号峰值增大; C. D. 两组大鼠下丘脑 NE 分泌信号达峰时间与半衰期差异无统计学意义。* $P < 0.05$,与对照组比较。

图2 应激性高血压模型组大鼠下丘脑 NE 分泌信号增大

2.3 Ralfinamide mesylate 抑制两组大鼠下丘脑 NE 分泌信号 两组大鼠在侧脑室注射 ralfinamide mesylate (i. c. v. 10 μg) 30 min 后,NE 释放的峰值比用药前减小 [对照组大鼠(89.5 ± 39.5) pA vs

(145.0 ± 35.8) pA $n = 6$ $t = 3.89$ $P < 0.05$; SIH 组大鼠(103.3 ± 30.9) pA vs (201.1 ± 53.2) pA $n = 10$ $t = 10.32$ $P < 0.05$],达峰时间及半衰期变化差异无统计学意义(见图3)。

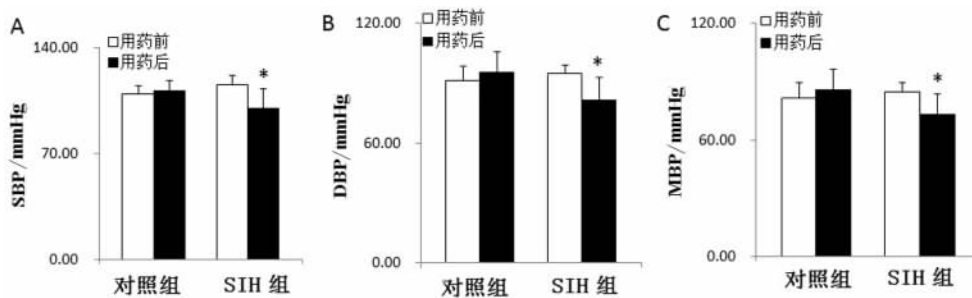


A. 大鼠用药(ralfinamide mesylate i. c. v. 10 μ g)前后下丘脑NE分泌信号; B. ralfinamide mesylate抑制两组大鼠下丘脑NE分泌信号的峰值; C、D. 两组大鼠下丘脑NE分泌信号的达峰时间及半衰期在用药前后变化差异无统计学意义。* $P < 0.05$, 两组大鼠用药前后比较。

图3 Ralfinamide mesylate抑制两组大鼠下丘脑NE分泌信号

2.4 Ralfinamide mesylate对大鼠血压的影响 两组大鼠侧脑室注射 ralfinamide mesylate (i. c. v. 10 μ g)后, SIH组大鼠SBP降低(100.1 \pm 12.5) mmHg vs (115.4 \pm 6.1) mmHg, $n = 8$, $t = 3.39$, $P < 0.05$, MBP降低(72.8 \pm 10.9) mmHg vs (84.6 \pm 4.7) mm-

Hg, $n = 8$, $t = 3.12$, $P < 0.05$, DBP降低(81.5 \pm 11.1) mmHg vs (94.8 \pm 4.3) mmHg, $n = 8$, $t = 2.80$, $P < 0.05$, 心率变化差异无统计学意义(见图4)。说明Ralfinamide mesylate减少了SIH组大鼠的血压。



A - C. ralfinamide mesylate降低SIH组大鼠SBP、MBP、DBP。* $P < 0.05$, SIH组大鼠用药前后比较。

图4 Ralfinamide mesylate降低SIH组大鼠的血压

3 讨论

应激反应的主要神经内分泌改变为蓝斑-去甲肾上腺素能神经元/交感-肾上腺髓质轴和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的强烈兴奋,以应激刺激模拟造成高血压的环境来制作高血压模型动物,其发病机理与人类高血压更接近^[5]。实验中采用电击结合噪声作为条件刺激,使应激心理成分大大增加,易化动物的心理反应,造成动物高血压。

实验中电刺激蓝斑核,模型组大鼠NE的释放峰值显著高于对照组,说明应激性高血压模型组大鼠蓝斑核投射到下丘脑的神经纤维末梢NE分泌比

正常大鼠增多,可见慢性应激也可以使大脑中NE分泌维持在较高水平,可能的机制就是触发了NE的长时程调控,导致合成的NE增多。微透析-高效液相色谱技术测定发现,应激性高血压大鼠下丘脑内NE的浓度有明显的升高,且相应的合成酶如酪氨酸羟化酶活性增强^[11]。应激反应激活蓝斑核NE能神经元,增加NE的合成及分泌,使下丘脑处及延髓头端腹外侧区等血压调节中枢的细胞外NE的浓度升高,可直接导致血压升高,并通过激活下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的活动,同时还激活交感-肾上腺髓质轴,提高交感缩血管神经的活动,导致外周

阻力升高,进而升高血压^[12-13]。

碳纤维电极安培法检测技术是给碳纤维电极表面 +700 mV 的稳定电压,使接近或吸附到碳纤维电极表面的 NE 发生氧化反应而释放出电子,碳纤维电极可俘获这些电子产生电流。根据所形成的电流总量的大小,可分析 NE 的分泌量,具有较高的时间分辨率。碳纤维电极测量技术可以直接从突触前神经元释放单胺类递质的角度了解神经系统功能的变化情况^[14]。实验中电刺激蓝斑核,碳纤维电极在下丘脑处记录到的 NE 信号中可能还有其他的可以氧化的神经化学物质(如 5-羟色胺、多巴胺、抗坏血酸等)但是因为刺激的是蓝斑去甲肾上腺素能神经元,此时引起的 NE 释放要远远高于其他递质,所以可以认为在下丘脑处通过碳纤维电极记录的分泌信号绝大部分是 NE 信号^[15]。

本实验中 ralfinamide mesylate 减少两组大鼠电刺激蓝斑核后下丘脑内 NE 的释放,说明 N-型电压门控性钙离子通道对下丘脑 NE 释放起调节作用,同时影响应激性高血压大鼠的血压水平。ralfinamide mesylate 既是 N-型电压门控性钙离子通道阻断剂,同时也可以阻断 TTX 不敏感的钠通道。N-型电压门控性钙离子通道在神经系统突触部位大量存在,参与调节神经元钙离子稳态,在中枢神经疼痛信息处理中发挥重要作用,也是治疗神经病理性疼痛的重要靶点^[16-18]。这也提示 ralfinamide mesylate 作为镇痛药应用时,对血压及中枢 NE 释放的影响也不可忽视,这为药物的合理使用提供了参考。中枢给予 ralfinamide mesylate 虽然对两组大鼠下丘脑内 NE 的释放都有抑制作用,但是对血压的影响只表现为降低应激性高血压大鼠的血压,而对正常大鼠血压影响不大,这说明血压的中枢调节机制不仅仅局限于下丘脑内 NE 释放的变化。

综上所述,随机发生的噪声结合足底电击刺激可以诱发制作应激性高血压动物模型。应激性高血压模型大鼠在电刺激蓝斑核后,下丘脑内实时检测到的 NE 分泌信号增大,阻断 N-型电压门控性钙离子通道可以抑制 NE 的分泌并且降低 SH 组大鼠的血压水平。

【参考文献】

[1] CHILDS E, WHITE TL, DE WIT H. Personality traits modulate emotional and physiological responses to stress [J]. *Behav Pharmacol* 2014, 25(5-6): 493-502.
 [2] BOBROVSKAYA L, BEARD D, BONDARENKO E *et al.* Does exposure to chronic stress influence blood pressure in rats [J]. *Auton Neurosci* 2013, 177(2): 217-223.

[3] FARAH VM, JOAQUIM LF, BERNATOVA I *et al.* Acute and chronic stress influence blood pressure variability in mice [J]. *Physiol Behav* 2004, 83: 135-142.
 [4] 董闻平. 慢性温和应激刺激对大鼠血压、心率的影响 [J]. *中外医疗* 2010, 35: 20-21.
 [5] 蒋春雷, 路长林. 应激医学 [M]. 上海科学技术出版社, 2006: 38-39.
 [6] MAYER AF, SCHROEDER C, HEUSSER K *et al.* Influences of norepinephrine transporter function on the distribution of sympathetic activity in humans [J]. *Hypertension* 2006, 48(1): 120-126.
 [7] STOTZ SC, BARR W, MCRORY JE *et al.* Several Structural domains contribute to the regulation of N-type calcium channel inactivation by the β_3 subunit [J]. *J Bio Chem* 2004, 279(5): 3793-3800.
 [8] 刘国树. 钙离子通道阻滞剂治疗高血压病新进展 [J]. *中国药物应用与监测* 2006, 3(4): 1-4.
 [9] SAMUELS ER, SZABADI E. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part II: Physiological and Pharmacological Manipulations and Pathological Alterations of Locus Coeruleus Activity in Humans [J]. *Current Neuropharmacology* 2008, 6: 254-285.
 [10] BEUCKMANN CT, SINTON CM, MIYAMOTO N *et al.* N-type calcium channel α_1B subunit (Cav2.2) knock-out mice display hyperactivity and vigilance state differences [J]. *J Neurosci* 2003, 23(17): 6793-6797.
 [11] PACÁK K, YADID G, JAKAB G *et al.* In vivo hypothalamic release and synthesis of catecholamines in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension* 1993, 22(4): 467-478.
 [12] SAMUELS ER, SZABADI E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organization [J]. *Curr Neuropharmacol* 2008, 6(3): 235-253.
 [13] SAMUELS ER, SZABADI E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans [J]. *Curr Neuropharmacol* 2008, 6(3): 254-285.
 [14] WANG SR, YAO W, HUANG HP *et al.* Role of vesicle pools in action potential pattern-dependent dopamine overflow in rat striatum in vivo [J]. *J Neurochem* 2011, 119(2): 342-353.
 [15] GONG WK, LÜ J, WANG F. Effects of angiotensin type 2 receptor on secretion of the locus coeruleus in stress-induced hypertension rats [J]. *Brain Research Bulletin* 2015, 111: 62-68.
 [16] ADAMS DJ, BERECKI G. Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Cav2.2) calcium channels [J]. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 1828: 1619-1628.
 [17] PAJOUHESH H, FENG ZP, ZHANG LY *et al.* Structure-activity relationships of trimethoxybenzyl piperazine N-type calcium channel inhibitors [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012, 22: 4153-4158.
 [18] ZHANG SH, BLECH-HERMONI Y, FARAVELLI L *et al.* Ralfinamide administered orally before hindpaw neurectomy or postoperatively provided long-lasting suppression of spontaneous neuropathic pain-related behavior in the rat [J]. *Pain* 2009, 139: 193-305.