

[文章编号] 1671-587X(2010)01-0023-04

## C型钠尿肽对家兔心房机械活动的影响及其作用机制

丁大植<sup>1,2</sup>, 崔勋<sup>2,3</sup>, 金秀男<sup>2,3</sup>, 兰颖<sup>2,3</sup>, 刘丽萍<sup>2,3</sup>, 洪兰<sup>2,3</sup>

(1. 延边大学附属医院心血管内科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学部基础医学院生理学与病理生理学教研部, 吉林 延吉 133000; 3. 延边大学长白山生物资源和功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133000)

**[摘要]** 目的: 观察C型钠尿肽(CNP)对心房机械活动和心房肌细胞内环核苷酸浓度的影响, 并探讨其作用机制。方法: 大耳白兔麻醉后立即开胸取出心脏置于氧饱和的36.5℃生理盐水中, 剥离左心房后立即固定在心房灌注装置上, 以不同浓度CNP(10、30和300 nmol·L<sup>-1</sup>)处理各1个循环后, 实时测定心房搏出量和心房搏动压。采用放射免疫法测定30 nmol·L<sup>-1</sup> CNP处理的cAMP和cGMP含量。结果: ①与对照循环组比较, 不同浓度的CNP(10、30和300 nmol·L<sup>-1</sup>)组家兔心房搏出量和心房搏动压均明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); CNP浓度越高心房搏出量和心房搏动压越低; 其中300 nmol·L<sup>-1</sup> CNP组心房搏出量和心房搏动压降低率分别达74.8%和76.9%。②与对照循环组比较, 30 nmol·L<sup>-1</sup> CNP组心房搏出量和心房搏动压均明显降低( $P < 0.01$ ); cGMP含量明显增多, 约增加10.2倍( $P < 0.01$ ), cAMP含量则无明显变化( $P > 0.05$ )。结论: CNP抑制家兔心房机械活动, 其机制与增加细胞内cGMP含量有关, 即经CNP-GC-cGMP信号转导途径调节心房机械活动。

**[关键词]** C型钠尿肽; 心房功能; 环核苷酸

**[中图分类号]** R54 **[文献标志码]** A

## Effect of C-type natriuretic peptide on atrial dynamics in beating rabbit atria and mechanism of action

DING Da-zhi<sup>1,2</sup>, CUI Xun<sup>2,3</sup>, JIN Xiu-nan<sup>2,3</sup>, LAN Ying<sup>2,3</sup>, LIU Li-ping<sup>2,3</sup>, HONG Lan<sup>2,3</sup>

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133000, China; 3. Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules, Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, China)

**Abstract: Objective** To examine the effects of C-type natriuretic peptide (CNP) on the atrial dynamics and cyclic nucleotides level in the atrial myocytes in rabbits and explore its mechanism of action. **Methods** Atria were obtained from New Zealand white rabbits, and the experiments were performed using a perfused beating atrial model. Briefly, the heart was removed from rabbit which had been anesthetized and the left atria was dissected free, and then it was fixed in perfused beating atrial model. The effects of CNP (10, 30, or 300 nmol·L<sup>-1</sup>) on atrial pulse pressure and atrial stroke volume were analyzed, and cAMP efflux and cGMP levels which were dealt with 30 nmol·L<sup>-1</sup> CNP were measured by radioimmunoassay. **Results** ① CNP (10, 30, and 300 nmol·L<sup>-1</sup>) significantly decreased the atrial pulse pressure and atrial stroke volume in perfused beating atria compared with

[收稿日期] 2009-08-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(30260033)

[作者简介] 丁大植(1964—), 男, 吉林省延吉市人, 副教授, 在读医学博士, 主要从事心脏内分泌和高血压靶器官损伤的研究。

[通信作者] 崔勋(Tel: 0433-2660584, E-mail: cuixun@ybu.edu.cn)

control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); these effects showed dose-dependent manner, and the maximum inhibitory rates in  $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP group were 74.8% and 76.9%, respectively. ②  $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP significantly decreased the atrial pulse pressure and atrial stroke volume in perfused beating atria compared with control group ( $P < 0.01$ ), and the cGMP level in the atrial myocytes was significantly increased, about 10.2 times, compared with control group ( $P < 0.01$ ), but the cAMP level didn't change ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** CNP can inhibit the atrial dynamics, its mechanism may be related to the increasing of cGMP level through CNP-GC-cGMP signal pathway in rabbit atria.

**Key words:** C-type natriuretic peptide; atrial function; cyclic nucleotide

自从1981年De Bold等<sup>[1]</sup>首次发现心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)以来,钠尿肽家族已有4个成员,即ANP、脑钠尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)、C型钠尿肽(C-type natriuretic peptide, CNP)和D型钠尿肽(dendrospis natriuretic peptide, DNP)。目前,ANP和BNP与心血管系统关系的研究较多<sup>[2-3]</sup>,但有关CNP的研究较少,尤其关于CNP对心房机械活动影响的研究甚少。本实验采用离体家兔心房灌流模型和实时评价环核苷酸代谢方法,观察CNP对心房机械活动和心房肌细胞内环核苷酸(环磷酸腺苷,cAMP;环磷酸鸟苷,cGMP)含量的影响,初步探讨其作用机制,为研究钠尿肽激素对心脏功能的影响提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、试剂及主要仪器** 大白耳家兔,体质量平均1.8 kg,由延边大学医学部实验动物科提供,合格证号SCXK(吉)2003-0005,饲养环境温度 $25^{\circ}\text{C}$ ,湿度70%。CNP-22购于Sigma公司。Gamma计数器为合肥众成机电技术公司产品;高效液相色谱仪(HPLC)为日本岛津公司产品;PowerLab生物记录系统为澳大利亚埃德仪器公司产品;蠕动泵Minipuls 3为法国Gilson公司产品;冷冻干燥仪(Speed Vac concentrator)为美国Savant Farmingdale, NY产品;心房灌流装置为本室自备。

**1.2 实验方法** 心房灌流模型的建立:利用巴比妥钠( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉家兔后,立即开胸取出心脏置于氧饱和的 $36.5^{\circ}\text{C}$ 生理盐水中,细心剥离左心房后立即固定在Cho等<sup>[4]</sup>研制的心房灌流装置上。该装置是利用埋藏有二根细管的外径为4 mm的透明聚乙烯套管制备而成。透明聚乙烯套管外表刻有测定心房每搏输出量的刻度,而且还埋藏一根白金电极用于电刺激。透明套管中的一根细管用于灌流缓冲液,另一根用于测定心房内压(心

房搏动压)。心房的灌流液是从透明套管的另一端收集,用于测定各项指标。将固定心房的灌流装置迅速固定在 $34^{\circ}\text{C}$ 的双重循环装置上,利用适宜的电刺激( $1.5 \text{ Hz}$ ,  $0.3 \text{ ms}$ ,  $20 \sim 40 \text{ V}$ )维持心房搏动。安置心房的培养皿内注入3 mL灌流缓冲液,并充分供应氧气。利用蠕动泵,向心房持续灌流氧饱和的缓冲液,灌流速度为 $1.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。灌流的缓冲液采用N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-甲磺酸(N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2'-ethanesulfonic acid, HEPES)缓冲液(pH 7.4),其组成如下:NaCl ( $118 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、KCl ( $4.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、CaCl<sub>2</sub> ( $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、MgCl<sub>2</sub> ( $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、NaHCO<sub>3</sub> ( $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、葡萄糖 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、HEPES ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、牛血清白蛋白( $0.1\%$ )。另外,利用生理记录仪持续记录心房内压的变化。心房每搏输出量(atrial stroke volume)是在心房舒缩活动时,将透明套管水柱的变化经过换算测得。心房搏出量(SV) = 透明套管水柱的变化 $\times 2$ /心房湿重 $\times 1000$  ( $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ )。

**1.3 实验步骤** ①待心房搏动稳定之后,经过1个对照循环(每12 min定为1个实验循环),10、30和 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP处理各1个循环,并实时测定家兔心房搏出量和搏动压;②经过1个对照循环, $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP处理后观察家兔心房搏出量、搏动压及心房肌细胞内cGMP及cAMP含量的变化。

**1.4 待测环核苷酸样本的处理** 取心房灌流液 $100 \mu\text{L}$ 添加 $900 \mu\text{L}$ 三氯乙酸(TCA,终浓度为6%),在室温下温育15 min后在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 下离心5 min。取上清液 $500 \mu\text{L}$ 移至聚丙烯试管中,并用水饱和的乙醚( $1.0 \text{ mL}$ )将其萃取3次后利用冻干机干燥样本。将干燥后的样本利用乙酸钠缓冲液重组并测定环核苷酸含量。

**1.5 放射免疫测定法检测cAMP含量** 心房灌流液内cAMP含量的测定采用Cui等<sup>[5]</sup>的放射免疫实时测定法,即利用含有 $8.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 茶碱的乙

酸钠缓冲液稀释的 cAMP 标准品和按上述方法处理的样本 100 L 中, 添加乙酸酐和三乙胺 (1:2) 的混合液 5.0 L 进行乙酰化处理。在 cAMP 标准品和样本中加入 cAMP 抗体 (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA) 和  $^{125}\text{I}$ -cAMP-TME (iodinated 2'-O-monosuccinyl-adenosine-cyclic monophosphate tyrosyl methyl ester, 10 000 cpm/100 L) 各 100 L, 在 4°C 下孵育 24 h 后, 采用活性炭缓冲液将结合型 (与相应抗体结合的 cAMP) 和游离型进行分离。将分离的结合型利用 Gamma 计数器测定其 cAMP 含量。 $^{125}\text{I}$ -cAMP-TME, 采用 Wen 等<sup>[6]</sup>方法制备, 其非特异性结合率 < 2.0%,  $\text{ED}_{50} = (16.50 \pm 0.79) \text{ fmol/tube}$  ( $n=10$ ), 组间和组内变化系数分别为 5.0% ( $n=10$ ) 和 9.6% ( $n=10$ )。cAMP 的含量用  $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  atrial tissue 表示。

1.6 放射免疫测定法检测 cGMP 含量 样本中 cGMP 量的测定采用 Kim 等<sup>[7]</sup>的方法, 将标准品和重组后的样本每管 100  $\mu\text{L}$  注入试管中, 然后再加抗-cGMP 血清每管 100  $\mu\text{L}$  和  $^{125}\text{I}$ -cGMP (10 000 cpm/100 L, 最终容量为每管 300  $\mu\text{L}$ ) 在 4°C 下孵育 24 h。将孵育后的标准品和样本利用活

性炭缓冲液将结合型 (与抗体结合的 cGMP) 和游离型进行分离。将分离后的结合型利用 Gamma 计数器测定其 cGMP 含量。cGMP 的含量用  $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  atrial tissue 表示。

1.7 统计学分析 采用 Prism 3.0 统计软件, 各组心房搏出量、心房搏动压和心房肌细胞内环核苷酸浓度以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

与对照循环组比较, 不同浓度的 CNP (10、30 和 300  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组心房搏出量和心房搏动压均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); CNP 浓度越高心房搏出量和心房搏动压越低; 其中 300  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP 组心房搏出量和心房搏动压降低率分别达 74.8% 和 76.9%。见表 1。

与对照循环组比较, 30  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  CNP 组心房搏出量和心房搏动压均明显降低 ( $P < 0.001$ ); cGMP 含量明显增多, 约增加 10.2 倍 ( $P < 0.01$ ), 而 cAMP 含量无明显变化 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 1 不同浓度 CNP 作用后家兔心房搏出量和心房搏动压的变化

Tab. 1 The changes of atrial pulse pressure and atrial stroke volume in rabbits after treated with different doses of CNP ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Dose ( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Atrial stroke volume ( $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Atrial pulse pressure (P/cm H <sub>2</sub> O)
Control cycle	0	576.00 ± 66.00	5.12 ± 0.56
CNP	10	403.00 ± 72.00*	4.53 ± 0.48*
CNP	30	336.00 ± 80.00**	3.58 ± 0.68**
CNP	300	230.00 ± 88.00**	2.15 ± 0.52**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared with control cycle group.

表 2 两组家兔心房搏出量、心房搏动压及心房肌细胞内环核苷酸浓度的比较

Tab. 2 Comparison of atrial pulse pressure, atrial stroke volume, cGMP level and cAMP level in rabbits between two groups ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Group	Dose ( $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Atrial stroke volume ( $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Atrial pulse pressure (P/cm H <sub>2</sub> O)	cGMP ( $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ )	cAMP [ $c_B / (\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1})$ ]
Control cycle	0	755 ± 089	7.46 ± 0.74	0.595 ± 0.062	1.94 ± 0.13
CNP	30	581 ± 109*	5.90 ± 0.78*	6.052 ± 0.680*	1.92 ± 0.17

\*  $P < 0.01$  compared with control cycle group.

## 3 讨论

心脏作为内分泌腺, 生成和分泌钠尿肽家族 (family of natriuretic peptide, NPs) 激素。CNP

是由 Sudoh 等<sup>[8]</sup>于 1990 年在猪的脑部发现的肽类激素, 是钠尿肽家族的第 3 个成员。既往研究<sup>[9-11]</sup>表明: CNP 可扩张血管, 抑制平滑肌细胞增殖、迁移及细胞外基质形成, 抑制血管内膜及心肌细胞

增殖,减少动脉硬化及斑块的形成,抑制重塑,抑制炎症反应。

本实验从心脏血流动力学角度探讨CNP对心房机械活动的影响。本实验结果显示:与对照循环组比较,不同浓度CNP(10、30和300 nmol·L<sup>-1</sup>)组心房搏出量和心房搏动压均明显降低。该结果与Nir等<sup>[12]</sup>在培养的大鼠心肌细胞中发现CNP降低心肌的收缩幅度的结果相似,但与Hirose等<sup>[13]</sup>在狗离体心脏模型中发现CNP呈剂量依赖性地增加心肌收缩力的结果和最近周广海等<sup>[14]</sup>在甲亢性肥大家兔中发现CNP增加心房机械活动的结果相悖,其原因可能与不同的实验动物、实验条件及不同的实验模型和方法有关。本文作者观察发现:CNP浓度越高心房输出量和心房搏动压越低;300 nmol·L<sup>-1</sup>CNP组与对照循环组比较,心房搏出量和心房搏动压降低幅度分别达74.8%和76.9%,表明CNP抑制心房机械活动,而且CNP浓度越高其抑制程度越强。

cAMP增强心房机械活动而cGMP抑制心房机械活动<sup>[15]</sup>。Cui等<sup>[5]</sup>研究证明:从心房肌细胞中cAMP和cGMP逸出的量能够实时地反映心房组织中环核苷酸浓度的变化。本实验结果显示:与对照循环组比较,30 nmol·L<sup>-1</sup>CNP组心房肌细胞内cGMP含量明显增多,约增加10.2倍,而cAMP含量没有显著性变化,表明CNP对家兔心房产生负性变力作用与其增加细胞内cGMP含量有关。

综上所述,CNP抑制心房机械活动,其机制与增加细胞内cGMP含量有关,即经CNP-GC-cGMP信号转导途径调节心房机械活动。

#### [参考文献]

- [1] De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, et al. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rats [J]. *Life Sci*, 1981, 28 (1): 89-94.
- [2] 张莹,金正元,崔勋,等.植物提取剂福司柯林对心房钠尿肽分泌的调节作用[J].*中国临床康复*, 2006, 10 (39): 107-110.
- [3] 赵雪燕,杨跃进,张健,等.B型钠尿肽对心力衰竭患者心源性事件的预测价值[J].*中国循环杂志*, 2008, 23 (3): 263-266.
- [4] Cho KW, Kim SH, Kim CH, et al. Mechanism basis of atrial natriuretic peptide secretion in beating atria: atrial stroke volume and ECF translocation [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268 (5pt2): R1129-R1136.
- [5] Cui X, Lee SJ, Kim SZ, et al. Effects of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide27 on cyclic AMP efflux and atrial dynamics in perfused beating atria [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 402 (1-2): 129-137.
- [6] Wen JF, Cui X, Jin JY, et al. High and low gain switches for regulation of Camp efflux concentration: Distinct roles for particulate GC-and soluble GC-cGMP-PDE3 signaling in rabbit atria [J]. *Cir Res*, 2004, 94 (7): 936-943.
- [7] Kim SZ, Kim SH, Park JK, et al. Presence and biological activity of C-type natriuretic peptide-dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum [J]. *J Urol*, 1998, 159 (5): 1741-1746.
- [8] Sudoh TN, Minamino K, Kanagawa HM. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of the natriuretic peptide family identified in porcine brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168 (2): 863-870.
- [9] 黄晓,程晓曙. C型钠尿肽与心血管疾病[J].*中华高血压杂志*, 2009, 17 (5): 474-477.
- [10] Passino C, Del Ry S, Severino S, et al. C-type natriuretic peptide expression in patients with chronic heart failure: effects of aerobic training [J]. *Eur J Cardiovas Prevent Rehab*, 2008, 15 (2): 168-172.
- [11] Rose RA, Hatano NJ. C-type natriuretic peptide activates a nonselective cation current in acutely isolated rat cardiac fibroblasts via natriuretic peptide C receptor-mediated signaling [J]. *Physiology*, 2007, 580 (pt 1): 255-274.
- [12] Nir A, Zhang DF, Fixler R, et al. C-type natriuretic peptide has a negative inotropic effect on cardiac myocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 41 (3) 2: 195-201.
- [13] Hirose M, Furukawa Y, Kurogouchi F, et al. C-type natriuretic peptide increases myocardial contractility and sinus rate mediated by guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors in isolated, blood-perfused dog heart preparations [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286 (1): 70-76.
- [14] 周广海,金松男,文今福. C型钠尿肽与甲亢性肥大心房血流动力学及内分泌功能的关系[J].*中华高血压杂志*, 2008, 16 (11): 994-998.
- [15] 杨宝峰,苏定冯.药理学[M]. 6版.北京:人民卫生出版社, 2005: 269-271.