

牦牛和柴达木黄牛低氧通气反应及颈动脉体 NO、NOS 的比较研究

张 寿¹, 靳国恩², 常 兰^{1*}, 吕 军¹, 沈明华¹, 刘 惠¹, 顾海燕¹, 雷乃虎³

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海大学医学院高原医学研究中心, 西宁 810001;

3. 青海省天峻县畜牧兽医工作站, 天峻 817200)

摘 要: 旨在比较牦牛和柴达木黄牛低氧通气反应(HVR)特征及颈动脉体(CB)中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)含量。选择生活在海拔 3 200 m 临床健康的成年牦牛和柴达木黄牛进行 13.9% O₂ 低氧(模拟海拔 6 000 m)通气反应;采用荧光定量 PCR、酶联免疫吸附(ELISA)双抗体夹心法和免疫组织化学方法对海拔 3 200 m 牦牛、柴达木黄牛及模拟海拔 6 000 m 时 CB 中的 NOS mRNA 和蛋白水平表达以及 NO 含量进行检测。结果表明:牦牛、柴达木黄牛低氧通气反应斜率($\Delta V_E/\Delta SaO_2$)分别为(0.21 ± 0.10)和(0.50 ± 0.21) (L · min⁻¹)/% SaO₂ (P < 0.01);海拔 3 200 m 时, CB 中 nNOS、eNOS、iNOS 基因 mRNA 和蛋白表达水平在牦牛与柴达木黄牛间差异均不显著(P > 0.05), 模拟海拔 6 000 m 时, CB 中 nNOS、eNOS、iNOS 蛋白表达水平在牦牛与柴达木黄牛间差异均不显著(P > 0.05), 模拟海拔 6 000 m 的牦牛、柴达木黄牛 CB 中 nNOS、eNOS、iNOS 蛋白表达水平分别与海拔 3 200 m 的牦牛、柴达木黄牛比较差异均不显著(P > 0.05);在模拟海拔 6 000 m 组, 牦牛、柴达木黄牛 CB 中 NO 含量均显著高于海拔 3 200 m (P < 0.01 或 P < 0.05), 在模拟海拔 6 000 m 组, 牦牛 CB 中 NO 含量极显著高于柴达木黄牛 (P < 0.01), 在海拔 3 200 m, 牦牛与柴达木黄牛 CB 中 NO 含量差异不显著(P > 0.05)。结果提示, 青藏高原世居牦牛低氧通气反应钝化, 而柴达木黄牛对低氧的刺激保持较高的通气反应, 急性低氧时牦牛 CB 内产生大量的 NO 可抑制对低氧的化学感受。

关键词: 牦牛; 柴达木黄牛; 低氧通气反应; 颈动脉体; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: S852.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)10-2276-07

Comparison on Hypoxic Ventilatory Response and NO, NOS of Carotid Body between Yaks and Qaidam Yellow Cattle

ZHANG Shou¹, JIN Guo-en², CHANG Lan^{1*}, LÜ Jun¹,
SHEN Ming-hua¹, LIU Hui¹, GU Hai-yan¹, LEI Nai-hu³

(1. College of Agriculture and Animal Husbandary, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Research Center for High Altitude Medical Science, Medical College of Qinghai University,

Xining 810001, China; 3. Tianjun County Amimal Husbandry and Veterinary

Station of Qinghai, Tianjun 817200, China)

Abstract: The aim of the present study to compare the hypoxic ventilatory response (HVR) characteristic and the content of nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS) in carotid body (CB) between yaks and Qaidam yellow cattle. In this study, health adult yaks and Qaidam yellow cattle at altitude of 3 200 m were inhaled hypoxic gas of 13.9% O₂, which was simulated to the altitude of 6 000 m; NO and NOS mRNA and NOS protein levels were detected in carotid body of

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(31360590)

作者简介: 张 寿(1964-), 男, 青海西宁人, 教授, 学士, 硕士生导师, 主要从事高原动物低氧适应研究, E-mail: qhzhangshou@163.com

* 通信作者: 常 兰, E-mail: changlan0123@163.com

yak and Qaidam yellow cattle living at altitude 3 200 m and simulate-altitude 6 000 m by the real-time quantitative PCR, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemical methods. The results showed that the slopes of HVR ($\Delta V_E/\Delta SaO_2$) in yaks and Qaidam yellow cattle were (0.21 ± 0.10) and (0.50 ± 0.21) ($L \cdot \min^{-1}/\% SaO_2$) ($P < 0.01$), respectively; There were no significant differences in the expression of the mRNA and protein of nNOS, eNOS, iNOS in CB between yak and Qaidam yellow cattle at altitude 3 200 m ($P > 0.05$), in the expression of the protein of nNOS, eNOS, iNOS in CB between yak and Qaidam yellow cattle at simulate-altitude 6 000 m ($P > 0.05$), in the expression of the protein of nNOS, eNOS, iNOS in yak CB between simulate-altitude 6 000 m and altitude 3 200 m, nor in Qaidam yellow cattle. The NO of the CB in yak and Qaidam yellow cattle at simulate-altitude 6 000 m was significantly higher than that of at altitude 3 200 m ($P < 0.01, P < 0.05$), respectively. The content of NO in yak CB was significantly higher than that of Qaidam yellow cattle at simulate-altitude 6 000 m ($P < 0.01$). No significant difference in the content of NO in CB between yaks and Qaidam yellow cattle at altitude 3 200 m ($P > 0.05$). The results suggested that HVR was blunted in Yak in Qinghai-Tibetan Plateau, and there was higher ventilatory response to hypoxia in Qaidam yellow cattle, NO production in the yak CB increases during acute hypoxia, and the elevated levels of NO may suppresses the CB response to hypoxia.

Key words: yak; Qaidam yellow cattle; hypoxic ventilatory response; carotid body; nitric oxide; nitric oxide synthase

增加肺的通气量是平原动物(包括人)进入高原后迅速适应高原低氧环境的反应之一。资料报道急性高山病(acute mountain sickness, AMS)^[1-2]的发病率与人的相对低通气量有关,增加通气量是防制 AMS 发生的主要措施之一。许多学者对人和动物有关低氧通气反应及其发生机制进行了大量研究,如 Chiodi^[3]报道美洲高原印第安人存在低氧通气反应(hypoxic ventilatory response, HVR)减弱和肺通气功能降低的趋势;Hodges 等^[4]对 3 个近交系大鼠品种和 1 个远交大鼠品种进行了对比试验研究,结果发现 HVR 受基因多样性的影响,不同品种的大鼠在低氧时呼吸表型(如频率、节奏)也不一样。Strohl 等^[5]报道 HVR 还受大鼠品种、个体、性别的影响,且品种是主要的影响因素。研究发现大鼠的每分通气量、频率、潮气量均与品种有关(如每分通气量 SD 大鼠大于 K 大鼠、Z 大鼠,频率 BN 大鼠大于 K 大鼠,潮气量 SD 大鼠大于 BN 大鼠、K 大鼠、Z 大鼠)。Ye 等^[6]研究发现大鼠颈动脉体(carotid body, CB)中低氧所诱导的一氧化氮(nitric oxide, NO)增加可以促进其对慢性低氧的适应性,而且结构性一氧化氮合酶(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)和诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)参与了 NO 生成,在慢性

低氧时 NO 生成增多又可钝化 CB 对低氧化学感受的敏感性等。有关高原牦牛颈动脉体形态学方面的研究我们已有报道^[7-8],但对牦牛 HVR 及其机制方面鲜有研究。为此,我们对生活在青藏高原(海拔 3 200 m)低氧环境中牦牛的 HVR 及 NO、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)含量与柴达木黄牛进行比较研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取青海省海西蒙古族藏族自治州(海拔 3 200 m)临床健康的成年雌性牦牛和柴达木黄牛各 10 头进行低氧(13.9% O_2)通气反应,经颈动脉放血处死后立即分离出 CB 投入液氮中,待用于 ELISA 双抗体夹心法检测。在屠宰季节另选取海拔 3 200 m 成年健康牦牛和柴达木黄牛各 10 头处死,迅速取出 CB,其中左侧 CB 置入 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, pH 7.4)中固定,用于免疫组织化学染色;右侧 CB 投入液氮中,分别用于 ELISA 双抗体夹心法检测和荧光定量 PCR。

1.2 方 法

1.2.1 低氧通气反应 牛保定后牛耳剪毛便于检测血氧饱和度(SaO_2)。戴上呼吸面罩(面罩呼气

口连接多功能生理信号采集系统)后,在常氧下呼吸 5~10 min,用 MP150 型多导电生理记录仪(16 通道)(美国 Biopac 公司)描记连续呼吸曲线,并用 YX301 型脉搏血氧仪测定血氧饱和度(SaO_2);吸入低氧(13.9% O_2)混合气体(模拟海拔 6 000 m) 12 min,重复记录上述内容;根据 MP150 型多导电生理记录仪记录的呼吸曲线采集潮气量(TV)、呼吸频率(Bf),计算每分通气量(V_E)= $TV \times Bf$ (60 s),用吸入低氧后 SaO_2 下降和 V_E 增加的绝对值的比值($\Delta V_E / \Delta SaO_2$)来计算低氧通气反应的斜率。

1.2.2 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 基因表达鉴定

1.2.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成:用 TRIZOL 法提取海拔 3 200 m 牦牛和柴达木黄牛 CB 总

RNA,选取 $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}}$ 值介于 1.8~2.0、浓度大于或等于 $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 者,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,总 RNA 电泳采用 $4.5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳强度,采用 First Strand cDNA Synthesis Kit(上海索宝生物公司)将提取鉴定的总 RNA 逆转录,并合成 cDNA,并将逆转录 PCR 产物保存于 -20°C 。

1.2.2.2 基因扩增引物设计:采用 NCBI 登录 GenBank,分别下载牛(*Bos taurus*, XM_015467111、NM_181037、NM_001076799)的 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ mRNA 序列,然后根据引物设计专用软件 Primer Premier 5.0 在基因序列保守区域设计特异性扩增引物,设计引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程公司合成。

表 1 牦牛和柴达木黄牛 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 荧光定量 PCR 引物

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer of $nNOS$, $eNOS$ and $iNOS$ of yak and Qaidam yellow cattle

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primers sequence	产物长度/bp Product length	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Annealing temperature
$nNOS$	AGCACCTTTGGCAATGGAGACCC	168	60
	GAGGAAACGCTGTTGAAACGCACC		
$eNOS$	GTTCCCTCGCGTGAAGAACT	199	59
	CTGGTTGATGAAGTCCCTGGC		
$iNOS$	CTTGTCTCTCGAGGTGCCCAT	174	60
	GTCCCGACTCCAACCTTCTG		

1.2.2.3 荧光定量 PCR 检测:按照 Hot Start Fluorescent PCR Core Reagent Kits (SYBR Green I) 说明书,取 GAPDH 标准品及样品等配制反应体系。配好 PCR 反应体系,放置于 ABI7500 PCR 仪上进行 PCR 反应。根据 ABI7500 预设条件,成倍稀释 cDNA 完成反应标准曲线,确保样品待测基因与内参照基因的扩增效率一致。

1.2.3 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 蛋白表达鉴定

采用酶联免疫吸附(ELISA)双抗体夹心法测定海拔 3 200 m 和模拟海拔 6 000 m 的牦牛和柴达木黄牛 CB 组织中 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 蛋白(美国 R&D 公司 ELISA kit 试剂盒,购自北京谊普生生物公司)。各步骤均严格按说明书进行。每项检测均设 3 个复孔。

1.2.4 免疫组化染色步骤 海拔 3 200 m 牦牛和柴达木黄牛 CB 经 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定、常规脱水、透明、包埋、连续切片,片厚 $4 \mu\text{m}$,隔 50

取 4,分成 4 套,其中 3 套分别用于 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 多克隆抗体免疫组化 SP 法染色,另外 1 套进行阴性对照。用于免疫组化染色的切片依次常规脱蜡至水、枸橼酸修复液高压修复、内源性过氧化物酶阻断液孵育、非免疫动物血清(羊)后分别入一抗(兔源性 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 多克隆抗体,1:200,武汉博士德公司)、置冰箱 4°C 过夜、生物素标记的羊抗兔 IgG、HRP 标记的链霉卵白素-抗生物素溶液(SP 试剂盒,福州迈新公司)、DAB 显色液呈色,各步骤间 PBS 液洗(非免疫动物血清和一抗间不洗)、苏木素染液复染、脱水、透明、封片。阴性对照试验用 PBS 液代替一抗。

光镜下观察切片,用图象采集系统数码照相,牦牛、柴达木黄牛各 5 头,每头牛 CB 组织取 5 张切片,每张 $nNOS$ 、 $eNOS$ 和 $iNOS$ 阳性切片选取着色最深视野拍照 2~3 张,每个因子共计 60 张。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件(德国)分析照

片,计算阳性区域平均光密度值(Mean optical density, MOD)。

1.2.5 统计分析 各试验数据用 SPSS 17.0 软件进行统计,牦牛和柴达木黄牛各指标比较采用独立样本 *T* 检验。结果都以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

表 2 NOS 基因 mRNA 在海拔 3 200 m 牦牛和柴达木黄牛 CB 表达差异($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the content of NOS mRNA in carotid body between yak and Qaidam yellow cattle at an altitude of 3 200 m ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	神经型一氧化氮合成酶 <i>n</i> NOS	内皮型一氧化氮合成酶 <i>e</i> NOS	诱导型一氧化氮合成酶 <i>i</i> NOS
牦牛 Yak	2.99±2.07	0.97±0.54	1.59±0.82
柴达木黄牛 Qaidam yellow cattle	0.60±0.24	1.26±0.17	2.97±2.41

与柴达木黄牛组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs Qaidam yellow cattle group; ** $P < 0.01$ vs Qaidam yellow cattle group

2.2 急性低氧(13.9%O₂)下牦牛和柴达木黄牛 HVR 比较

牦牛、柴达木黄牛在常氧下(海拔 3 200 m) V_E 分别为(46.62±13.99)和(22.76±8.97) L·min⁻¹ ($P < 0.01$),SaO₂ 为(89.80±4.34)%和(85.25±6.76)% ($P > 0.05$);吸入低氧混合气体(13.9% O₂)后, V_E 分别为(50.11±13.86)和(30.20±8.29) L·min⁻¹ ($P < 0.01$),SaO₂ 下降至(71.92±8.43)%和(69.66±6.18)% ($P > 0.05$)。故低氧通气反应的斜率(V_E 的增加和 SaO₂ 下降的绝对值的比值即两组 $\Delta V_E / \Delta SaO_2$)分别为(0.21±0.10)和(0.50±0.21) (L·min⁻¹)/% SaO₂ ($P < 0.01$)。

2.3 急性低氧(13.9%O₂)下牦牛和柴达木黄牛颈动脉体中 NOS 和 NO 比较

由表 3 可知,生活在海拔 3 200 m 组(即常氧下)牦牛 CB 中 *n*NOS、*e*NOS、*i*NOS 活性和 NO 含量分别与柴达木黄牛的相比均没有显著差异($P > 0.05$)。在急性低氧(13.9%O₂)组(模拟海拔 6 000 m 组)中,牦牛 CB 中 *n*NOS、*e*NOS、*i*NOS 活性分别与柴达木黄牛相应值相比无显著差异($P > 0.05$),但牦牛 CB 中 NO 含量明显高于柴达木黄牛($P < 0.01$);急性低氧(13.9%O₂)组的牦牛和柴达木黄牛 CB 中 *n*NOS、*e*NOS、*i*NOS 与海拔 3 200 m 组的相应值比较,均无

2 结 果

2.1 NOS 基因 mRNA 在海拔 3 200 m 牦牛和柴达木黄牛 CB 表达差异

牦牛颈动脉体中 *n*NOS 基因 mRNA 表达水平高于柴达木黄牛,而 *e*NOS、*i*NOS 基因 mRNA 表达水平分别低于柴达木黄牛,差异均不显著($P > 0.05$) (表 2)。

显著差异($P > 0.05$),而 NO 含量均分别明显高于海拔 3 200 m 组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.4 NOS 蛋白在牦牛和柴达木黄牛 CB 中表达的形态学差异

由图 1 和表 4 可以看出,CB 实质由大量的圆形或椭圆形的小球密集组合而成,小球主要由分布于其外围的“C”型并成簇排列的球细胞组成。NOS 的 *n*NOS、*e*NOS、*i*NOS 蛋白在牦牛和柴达木黄牛 CB 中均有表达,且主要表达于 CB 成簇的球细胞中;牦牛 *n*NOS 和 *i*NOS 蛋白水平表达显著高于柴达木黄牛,差异均极显著($P < 0.01$),而 *e*NOS 蛋白水平表达极显著低于柴达木黄牛($P < 0.01$)。

3 讨 论

平原人暴露在高原后 HVR 会增强,肺的通气量也增大^[9]。研究还表明高原世居人对 HVR 迟钝^[3,10-12],Severinghaus 等^[11]、Lahiri 和 Milledge^[12] 分别在玻利维亚的印第安人和喜马拉雅的舍巴人的研究中获得了同样的结果。研究发现外周化学感受器去敏感性可导致高原世居人的 HVR 迟钝,这种去敏感现象发生于长期暴露在高原低氧环境下的几代人当中。杨生岳等^[13]对平原移居至海拔 4 750 m 20~80 d 的汉族(短居组)、3~20 年的汉族(久居组)

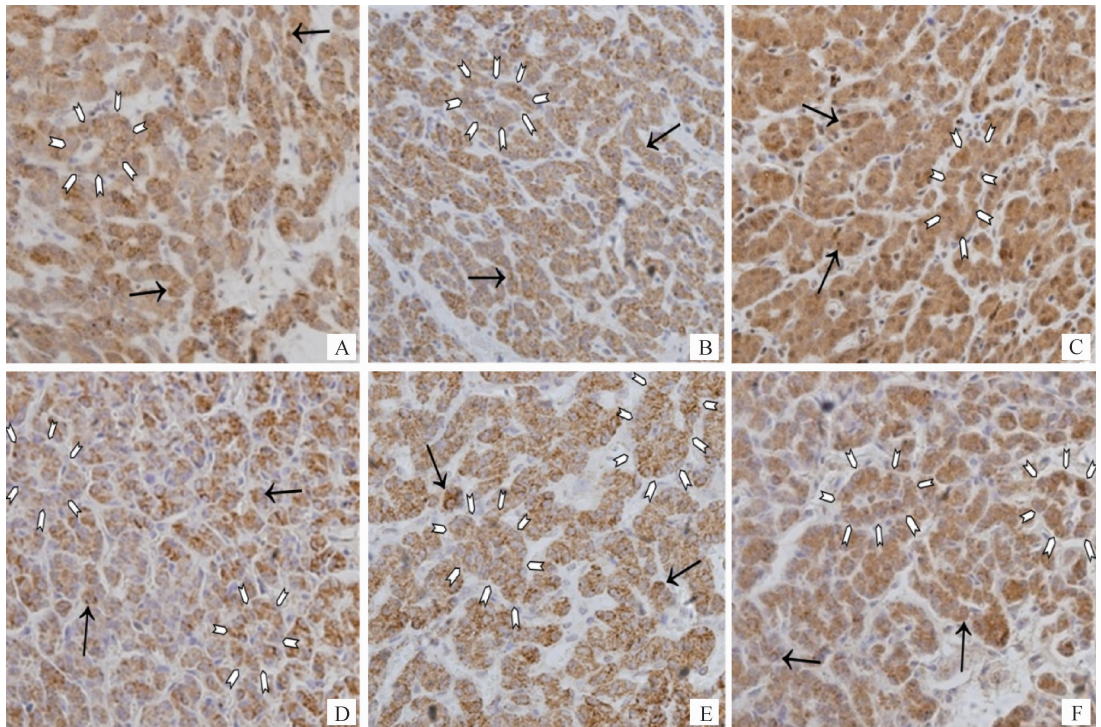
表 3 急性低氧下牦牛和柴达木黄牛颈动脉体中 NOS 和 NO 比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Comparison of the NOS and NO in carotid body of yak and Qaidam yellow cattle in acute hypoxia ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Group	海拔 3 200 m 组 Altitude 3 200 m group				低氧(13.9%O ₂)组 Hypoxia(13.9%O ₂)group			
	nNOS/ (ng · mL ⁻¹)	eNOS/ (ng · mL ⁻¹)	iNOS/ (pg · mL ⁻¹)	NO/ (nmol · mL ⁻¹)	nNOS/ (ng · mL ⁻¹)	eNOS/ (ng · mL ⁻¹)	iNOS/ (pg · mL ⁻¹)	NO/ (nmol · mL ⁻¹)
牦牛 Yak	8.92 ± 2.26	4.02 ± 1.40	205.36 ± 29.35	20.15 ± 7.51	9.59 ± 1.41	4.19 ± 1.27	312.25 ± 53.24	59.74 ± 8.67 ^{**#}
柴达木黄牛 Qaidam yellow cattle	7.15 ± 2.90	4.69 ± 1.07	218.15 ± 16.94	9.58 ± 2.64	8.29 ± 2.02	3.09 ± 0.16	250.02 ± 32.41	26.08 ± 4.74 [#]

与柴达木黄牛组比较, * *. $P < 0.01$; 与海拔 3 200 m 组比较, #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$

* *. $P < 0.01$ vs Qaidam yellow cattle group; #. $P < 0.05$, ##. $P < 0.01$ vs altitude 3 200 m group



A~C. 牦牛; D~F. 柴达木黄牛; A, D. nNOS; B, E. eNOS; C, F. iNOS; ↓. 小球. ↑. 球细胞

A-C. Yak; D-F. Qaidam yellow cattle; A, D. nNOS; B, E. eNOS; C, F. iNOS; ↓. Globule; ↑. Globule cell

图 1 牦牛和柴达木黄牛 CB 中 nNOS, eNOS, iNOS 蛋白表达 (免疫组织化学染色 40×)

Fig. 1 The expression of nNOS, eNOS and iNOS in carotid body of yak and Qaidam yellow cattle (Immunohistochemical staining 40×)

表 4 牦牛和柴达木黄牛 CB 中 NOS 蛋白平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The MOD of NOS protein in CB of yak and Qaidam yellow cattle ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	神经型一氧化氮合成酶 nNOS	内皮型一氧化氮合成酶 eNOS	诱导型一氧化氮合成酶 iNOS
牦牛 Yak	0.20 ± 0.02 ^{**}	0.18 ± 0.02 ^{**}	0.27 ± 0.04 ^{**}
柴达木黄牛 Qaidam yellow cattle	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01

与柴达木黄牛组比较, * *. $P < 0.01$

* *. $P < 0.01$ vs Qaidam yellow cattle group

和当地世居藏族(世居组)进行了 HVR 研究,结果表明,短居高原汉族的 HVR 较久居高原汉族和世居高原藏族敏感,且后两组 HVR 迟钝但无明显差异,说明久居高原汉族的 HVR 也变得迟钝,并获得与世居高原藏族相似的 HVR。但也有高原世居人对 HVR 并不迟钝的报道,孙新甫等^[14]对海拔 3 658 m 高原(拉萨)世居藏族及已习服的移居汉族的 HVR 进行了比较,发现世居组 HVR 高于移居组。而格日力等^[15]对居住在青藏高原海拔 2 000~3 000 m(中海拔)和 4 000~4 700 m(高海拔)地区藏族的低氧(12% O₂)通气反应进行了研究,结果发现,中海拔组对低氧的刺激反应保持着较高的通气反应,而高海拔组则显示钝化,认为高原人通气反应的钝化与居住地的海拔高度有关。本次研究发现吸入低氧(13.9% O₂)后,牦牛 SaO₂下降的程度略大于柴达木黄牛,且每分通气量的增加量在牦牛和柴达木黄牛间有明显差异,即牦牛 V_E增加的绝对值小于柴达木黄牛。因此,ΔV_E/ΔSaO₂的斜率明显减小,说明牦牛比柴达木黄牛有着较低的 HVR。

一般认为 HVR 的减弱与 CB 的结构或生化改变有关。Donovan 等^[16]研究发现 BN 大鼠在低氧环境下表现出较低的急性通气反应,而 SD 大鼠呈现较高的通气反应,但 BN 大鼠 TH 阳性和 nNOS 阳性区域均大于 SD 大鼠。I型细胞中线粒体被认为与 CB 氧感受有关,我们先前的研究表明牦牛 I型细胞线粒体数量明显少于柴达木黄牛^[8],牦牛也有着比柴达木黄牛较低的 HVR。另外,在常氧下(海拔 3 200 m)牦牛通气量(46.62±13.99) L·min⁻¹,显著大于柴达木黄牛的(22.76±8.97) L·min⁻¹,这也可能是牦牛比柴达木黄牛有着较低 HVR 的原因之一。

急性氧感受是个体在低氧状态下生存的必要条件。CB 是主要的外周化学感受器,其含调节离子通道含有的易兴奋和氧敏感的球细胞。机体暴露于急性低氧环境下,K⁺通道的抑制是触发细胞去极化、神经递质释放和刺激脑干呼吸中枢产生超通气的感觉纤维激活信号。最新的研究表明^[17],大鼠两侧 CB 去神经后 5 周,呼吸节奏缓慢而不规律,10 周后呼吸频率与假手术组间无差异,但呼吸节奏的规律性仍然在减少。增加随机呼吸暂停的频率可能是 CB 去神经后产生不规则呼吸模式的原因。在常氧下 NO 能增加去化学感受效应,而在低氧条件下,NO 是 CB 化学感受的主要抑制调节器,它直接调节球细胞和岩神经节神经元的兴奋性,间接调节血管

紧张性和氧传递^[18]。Fung 等^[19]研究发现,在低氧状态下大鼠 CB 中内源性 NO 生成增多,NO 的升高可抑制颈动脉化学感受器对低氧的反应。NOS 催化 L-精氨酸而生成 NO。Valdés 等^[20]报道,在猫 CB 中 nNOS 和 eNOS 都参与 NO 的生成,但 eNOS 是 NO 的主要来源,并且加强化学感受活动。本研究中,海拔 3 200 m(常氧下),牦牛颈动脉体中 nNOS 基因 mRNA 和蛋白表达水平、NO 含量均高于柴达木黄牛,而 eNOS、iNOS 基因 mRNA 和蛋白表达水平分别低于柴达木黄牛,但差异均不显著(P>0.05);免疫组化的研究结果表明牦牛 CB 中 nNOS 也高于柴达木黄牛(P<0.01),eNOS 蛋白水平表达也低于柴达木黄牛(P<0.01),但 iNOS 蛋白水平表达却高于柴达木黄牛(P<0.01),说明牦牛 CB 中 nNOS、eNOS 蛋白含量最高区域的平均光密度值均高于柴达木黄牛,而 iNOS 蛋白含量最高区域的平均光密度值低于柴达木黄牛。急性低氧(13.9% O₂)组(模拟海拔 6 000 m)牦牛和柴达木黄牛 CB 中 nNOS、eNOS、iNOS 活性分别大于海拔 3 200 m 组,相应指标差异均不显著(P>0.05),而 NO 含量则显著高于海拔 3 200 m 组(P<0.01,P<0.05),并且在急性低氧(13.9% O₂)(模拟海拔 6 000 m)状态下,牦牛颈动脉体中 NO 含量极显著高于柴达木黄牛(P<0.01),可见急性低氧可导致牦牛和柴达木黄牛 CB 中产生大量 NO,且牦牛明显多于柴达木黄牛。综上所述,在急性低氧条件下牦牛 CB 中高含量的 NO 阻止了 CB 对低氧的感受,同时钝化了牦牛的 HVR。

4 结 论

青藏高原世居牦牛低氧通气反应钝化,而柴达木黄牛对低氧的刺激保持较高的通气反应,急性低氧时牦牛 CB 内产生大量的 NO 可抑制对低氧的化学感受。

参考文献(References):

- [1] HACKETT P H, RENNIE D, HOFMEISTER S E, et al. Fluid retention and relative hypoventilation in acute mountain sickness [J]. *Respiration*, 1982, 43(5):321-329.
- [2] SUTTON J R, BRYAN A C, GRAY G W, et al. Pulmonary gas exchange in acute mountain sickness [J]. *Aviat Space Environ Med*, 1976, 47(10):1032-

- 1037.
- [3] CHIUDI H. Respiratory adaptations to chronic high altitude hypoxia[J]. *J Appl Physiol*, 1957, 10(1): 81-87.
- [4] HODGES M R, FORSTER H V, PAPANEK P E, et al. Ventilatory phenotypes among four strains of adult rats [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93 (3): 974-983.
- [5] STROHL K P, THOMAS A J, ST JEAN P, et al. Ventilation and metabolism among rat strains[J]. *J Appl Physiol*, 1997, 82(1):317-323.
- [6] YE J S, TIPOE G L, FUNG P C, et al. Augmentation of hypoxia-induced nitric oxide generation in the rat carotid body adapted to chronic hypoxia: an involvement of constitutive and inducible nitric oxide synthases [J]. *Pflügers Arch*, 2002, 444 (1-2): 178-185.
- [7] 常 兰,张 寿,雷乃虎,等. 牦牛和柴达木黄牛颈动脉体的组织微细结构比较[J]. 解剖学报, 2016, 47(3):374-380.
CHANG L, ZHANG S, LEI N H, et al. Comparison of microstructures of the carotid body between yaks and Chaidamu yellow cattle[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2016, 47(3):374-380. (in Chinese)
- [8] 常 兰,张 寿,雷乃虎,等. 牦牛和柴达木黄牛的颈动脉体 I 型细胞线粒体和电子致密核心囊泡的体视学比较[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(7):1474-1479.
CHANG L, ZHANG S, LEI N H, et al. Stereologic study on mitochondria and electron dense-cored vesicles of carotid body type I cells between yak and Qaidam yellow cattle[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(7):1474-1479. (in Chinese)
- [9] CRUZ J C, REEVES J T, GROVER R F, et al. Ventilatory acclimatization to high altitude is prevented by CO₂ breathing[J]. *Respiration*, 1980, 39(3): 121-130.
- [10] HACKETT P H, REEVES J T, REEVES C D, et al. Control of breathing in sherpas at low and high altitude[J]. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1980, 49(3):374-379.
- [11] SEVERINGHAUS J W, BAINTON C R, CARCELEN A. Respiratory insensitivity to hypoxia in chronically hypoxic man[J]. *Respir Physiol*, 1966, 1(3):308-334.
- [12] LAHIRI S, MILLEDGE J S. Acid-base in Sherpa altitude residents and lowlanders at 4880 M[J]. *Respir Physiol*, 1967, 2(3):323-334.
- [13] 杨生岳,冯恩志,马子琪. 高原世、移居者对低、高氧通气反应的研究[J]. 高原医学杂志, 1994(3): 40-43.
YANG S Y, FENG E Z, MA Z Q. Ventilatory response to both progressive hypoxia and O₂ breathing in lowlanders and highlanders at high altitude[J]. *Journal of High Altitude Medicine*, 1994(3): 40-43. (in Chinese)
- [14] 孙新甫,庄建国,扎西卓玛,等. 拉萨健康藏汉族成人低氧通气反应及肺通气功能比较研究[J]. 中国应用生理学杂志, 1995, 11(3):264-267.
SUN X F, ZHUANG J G, ZHAXI Z M, et al. A comparative study on hypoxic ventilatory responsiveness and ventilation between healthy Tibetan and Han adults in Lhasa [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 1995, 11(3):264-267. (in Chinese)
- [15] 格日力,陈秋红,和伦高娃,等. 中高海拔地区藏族低氧通气反应的特征[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(6):364-366.
GE R L, CHEN Q H, HELUN G W, et al. Characteristics of hypoxic ventilatory response in Tibetan living at moderate and high altitudes [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 1994, 17(6):364-366. (in Chinese)
- [16] DONOVAN L M, CHAI S, GILLOMBARDO C B, et al. Ventilatory behavior and carotid body morphology of Brown Norway and Sprague Dawley rats[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2011, 178(2):250-255.
- [17] SHEIKHBAHAEI S, GOURINE A V, SMITH J C. Respiratory rhythm irregularity after carotid body denervation in rats [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2017, 246:92-97.
- [18] MOYA E A, ALCAYAGA J, ITURRIAGA R. NO modulation of carotid body chemoreception in health and disease [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 184(2):158-164.
- [19] FUNG M L, YE J S, FUNG P. Acute hypoxia elevates nitric oxide generation in rat carotid body *in vitro* [J]. *Pflügers Arch*, 2001, 442(6): 903-909.
- [20] VALDÉS V, MOSQUEIRA M, REY S, et al. Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(1):L57-L68.