

酸敏感离子通道在大鼠低 O₂ 高 CO₂ 所致呼吸效应中的作用

李 丽¹ 刘文彦² 苗文静³

(¹ 济宁医学院药学院, 山东 日照 276826; ² 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ³ 日照市妇幼保健院, 日照 276826)

摘要 目的 观察大鼠吸入低 O₂ 和高 CO₂ 气体产生的呼吸效应, 探讨酸敏感离子通道(acid sensing ion channel, ASICs)在此过程中的作用。**方法** 将健康成年 SD 大鼠 40 只随机分为生理盐水+空气对照组(n=8)、生理盐水+低 O₂ 组(n=8)、生理盐水+高 CO₂ 组(n=8)、ASICs 阻断剂阿米洛利+低 O₂ 组(n=8)、阿米洛利+高 CO₂ 组(n=8)。通过气管插管侧管吸入低 O₂ 和高 CO₂ 气体, 以膈肌肌电为指标, 记录低 O₂ 和高 CO₂ 引起的呼吸效应; 通过脑室内预先注射阿米洛利, 然后再吸入低 O₂ 和高 CO₂ 气体, 观察脑室内微注射阿米洛利对低 O₂ 和高 CO₂ 气体所致呼吸反应的影响。**结果** 对生理盐水+空气对照组大鼠, 气管插管侧管吸入空气后呼吸较吸入空气前无明显变化(P>0.05), 脑室内预微注射生理盐水对呼吸没有产生明显影响(P>0.05)。生理盐水+低 O₂ 组大鼠, 缺氧 30min 后, 呼吸较缺氧前表现为明显的抑制(P<0.01); 阿米洛利+低 O₂ 组大鼠, 脑室内预微注射阿米洛利后, 缺氧后 30min 较缺氧前尚未表现为呼吸抑制(P>0.05)。生理盐水+高 CO₂ 组大鼠, 吸入高 CO₂ 气体 1min, 呼吸表现为明显的兴奋(P<0.01); 脑室内预微注射阿米洛利后, 呼吸兴奋的程度明显减弱(P<0.01)。**结论** ASICs 参与了缺氧所致的呼吸抑制和高 CO₂ 所致的呼吸兴奋过程的产生。

关键词 ASICs; 阿米洛利; 呼吸调节; 低 O₂; 高 CO₂

中图分类号: R743.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2015)08-243-05

Effect of ASICs on the respiratory responses induced by hypoxia and inhalation of high concentrated CO₂ in rats

LI Li, LIU Wenyan, MIAO Wenjing

(School of Pharmaceutical Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To study the respiratory responses induced by hypoxia and inhalation of high concentrated CO₂, and to discuss the function of acid sensing ion channels(ASICs) in this process. **Methods** 40 healthy SD rats were divided into normal saline plus air control group(n=8), normal saline plus hypoxia group(n=8), normal saline plus high CO₂ group(n=8), amiloride plus hypoxia group(n=8) and amiloride plus high CO₂ group(n=8). Hypoxic gas and high concentrated CO₂ were inhaled by one side tube of tracheal intubation. The electromyogram (EMG) of diaphragm was monitored to observe the respiratory responses induced by hypoxia and high concentrated CO₂. ASICs blockers amiloride was injected into the ventricle firstly and hypoxic and high concentrated CO₂ gas was inhaled followed by observing the effect of ASICs on the respiratory regulation in this process. **Results** Respiration didn't change obviously after inhalation of air in the rats of normal saline plus air control group(P>0.05) and intra-ventricle normal saline firstly could not affect the respiratory responses(P>0.05). Respiration were inhibited after 30 minutes of inhalation of hypoxic gas in the rats of normal saline plus hypoxia group(P<0.01), but in the rats of amiloride plus hypoxia group, respiration didn't obviously show inhibition after 30 minutes of inhalation of hypoxic gas(P>0.05). Respiration appeared excitation apparently after 1 minute of inhalation of high concentrated CO₂ in the rats of normal saline plus high CO₂ group(P<0.01), but in the rats of amiloride plus high CO₂ group, the degree of respiratory excitation was decreased prominently(P<0.01). **Conclusion** ASICs participated in the process of respiratory inhibition induced by hypoxia and respiratory excitation induced by inhalation of high concentrated CO₂.

Keywords: ASICs; Amiloride; Respiratory regulation; Hypoxia; High concentrated CO₂

缺氧是呼吸的常见刺激因素,重度缺氧可损害呼吸中枢神经元,引起呼吸抑制^[1]。酸敏感离子通道(acid sensing ion channel, ASICs)为非电压门控的主要通道 Na^+ 的通道,由细胞外酸化激活^[2]。缺氧时无氧糖酵解增强,组织酸化,ASICs 易被激活。已有研究表明,局灶性脑缺血缺氧后,脑室内注射 ASICs 阻断剂能明显减轻脑组织的缺氧性损害^[3]。由此推测,ASICs 可能是引起缺氧性细胞损害的重要原因,而 ASICs 阻断剂阿米洛利对此则具有保护作用。 CO_2 可以间接通过 H^+ 刺激中枢化学感受器引起呼吸兴奋,而 ASICs 则在细胞外液 $[\text{H}^+]$ 升高时被激活,故 ASICs 也可能在 CO_2 引起的呼吸兴奋效应中发挥作用。本文通过脑室内预先微注射阿米洛利,再给 SD 大鼠吸入低氧和高 CO_2 气体,以膈肌肌电为指标,观察 ASICs 对大鼠缺氧性呼吸抑制及高 CO_2 所致呼吸兴奋反应的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用健康成年 SD 大鼠共 40 只,雌雄不拘,体重 250~300g,由山东大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

阿米洛利购自 Sigma 公司。

1.3 实验方法

健康成年 SD 大鼠随机分为生理盐水+空气对照组($n=8$)、生理盐水+低 O_2 组($n=8$)、生理盐水+高 CO_2 组($n=8$)、阿米洛利+低 O_2 组($n=8$)、阿米洛利+高 CO_2 组($n=8$)。动物经 20% 的乌拉坦以 1000mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉后,分别行气管插管、双侧迷走神经分离并剪断、剑突下暴露膈肌并记录膈肌肌电等操作。将大鼠以先固定双耳、再固定门齿的顺序固定于脑立体定位仪中,且保持其头位水平。参照 Paxinos 和 Watson 的《鼠脑立体定位图谱》,以 Bregma 点向后 1.0mm,中线旁开 1.5mm 处为穿刺点,通过微量进样器垂直进针 3.5~4.0mm 向侧脑室内缓慢并匀速的注射药物。

1.3.1 生理盐水+空气对照组 先向其侧脑室内微注射生理盐水($10\mu\text{l}$),再向其气管插管侧管内通入流量为 200 ml/min 的空气,在微量注射药物前 5min、注射药物即刻每 5min 以膈肌肌电监测 1 次呼吸,每次监测 1min。

1.3.2 生理盐水+低 O_2 组 除向大鼠气管插管

侧管内通入相同流量的纯氮气外,其余操作同生理盐水+空气对照组。

1.3.3 生理盐水+高 CO_2 组 除向大鼠气管插管侧管通入相同流量的纯 CO_2 气体外,其余操作同生理盐水+空气对照组。

1.3.4 阿米洛利+低 O_2 组 除向大鼠侧脑室内微注射阿米洛利(10mM , $10\mu\text{l}$)外,其余操作同生理盐水+低 O_2 组。

1.3.5 阿米洛利+高 CO_2 组 除向大鼠侧脑室内微注射阿米洛利(10mM , $10\mu\text{l}$)外,其余操作同生理盐水+高 CO_2 组。手术操作结束后,待动物恢复 30min 后再进行侧脑室微注射。膈肌肌电呼吸的变化以吸气时程(inspiratory time, TI)、呼气时程(expiratory time, TE)、呼吸频率(respiratory frequency, RF)和吸气幅度(amplitude of inspiration, Amp)为指标经 BL-420 生物机能实验系统进行观察和分析。实验结束后,向脑室内注入 20g/L 美蓝溶液 0.5 μl ,处死动物开颅取脑,100ml/L 甲醛固定 24h,切开鉴定药物注射部位,凡未注入侧脑室的动物结果弃去。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 分析软件进行统计学处理。

2 结果

2.1 阿米洛利对大鼠缺氧所致呼吸抑制效应的影响

生理盐水+空气对照组大鼠,吸入空气前后呼吸无明显改变($P>0.05$)。脑室内预注射生理盐水对呼吸也未产生明显影响($P>0.05$)。生理盐水+低 O_2 组大鼠,缺氧即刻、缺氧后第 10 min、20 min 呼吸明显兴奋,即较缺氧前 TI、TE 明显缩短;RF 明显增快;Amp 明显增大($P<0.01$)。缺氧后 30 min 呼吸明显抑制,即较缺氧前 TI 明显变短;TE 明显延长;RF 明显减慢;AMP 明显减小($P<0.01$)。阿米洛利+低 O_2 组大鼠,缺氧即刻、缺氧后第 10 min、20 min 呼吸效应与生理盐水+低 O_2 组动物无明显差异,但缺氧后 30 min 较缺氧前 TI 明显缩短,TE 明显延长,RF 明显增快($P<0.01$),AMP 较缺氧前无显著变化($P>0.01$),即在缺氧后 30 min 呼吸尚未出现明显抑制。见表 1、图 1。

2.2 阿米洛利对大鼠高 CO_2 所致呼吸兴奋效应的影响

生理盐水+高 CO_2 组大鼠,吸入 CO_2 1min 内,呼吸表现出明显的兴奋。即较吸入 CO_2 前

TI、TE 明显缩短;RF 明显增快;Amp 明显增大($P < 0.01$)。阿米洛利+高 CO_2 组大鼠,吸入 CO_2 1min 内,呼吸也表现出明显的兴奋,以($|CO_2$ 1-pre- $CO_2|/pre- $CO_2 \times 100\%$) 计算在吸入 CO_2 后$

1min 的 TI、TE、RF、Amp 的变化率,阿米洛利+高 CO_2 组呼吸的变化率明显低于生理盐水+高 CO_2 组($P < 0.01$)。见表 2、表 3、图 2。

表 1 脑室内注射阿米洛利对大鼠缺氧性呼吸抑制的影响

吸气时间	生理盐水+空气对照组		生理盐水+低 O_2 组		阿米洛利+低 O_2 组	
	F 值	P	F 值	P	F 值	P
吸气时程						
吸气前	0.62±0.03		0.64±0.02		0.63±0.04	
吸气 1min	0.61±0.04	1.32 >0.05	0.30±0.03*	28.41 <0.01	0.31±0.05*	16.11 <0.01
吸气 10min	0.63±0.03	2.67 >0.05	0.32±0.04*	21.37 <0.01	0.33±0.05*	16.24 <0.01
吸气 20min	0.63±0.06	1.42 >0.05	0.35±0.04*	19.32 <0.01	0.32±0.04*	17.52 <0.01
吸气 30min	0.64±0.03	1.33 >0.05	0.24±0.05*	21.07 <0.01	0.21±0.05*	20.54 <0.01
呼气时程						
吸气前	0.70±0.04		0.71±0.05		0.73±0.05	
吸气 1min	0.72±0.03	1.13 >0.05	0.26±0.06*	16.54 <0.01	0.26±0.05*	20.88 <0.01
吸气 10min	0.69±0.05	2.43 >0.05	0.38±0.04*	14.39 <0.01	0.38±0.04*	15.47 <0.01
吸气 20min	0.73±0.04	1.54 >0.05	0.40±0.05*	14.44 <0.01	0.41±0.04*	14.33 <0.01
吸气 30min	0.73±0.05	2.30 >0.05	1.26±0.05*	24.04 <0.01	0.87±0.04*	7.38 <0.01
呼吸频率						
吸气前	45±9		44±5		43±6	
吸气 1min	43±7	1.52 >0.05	101±11*	15.32 <0.01	102±11*	15.34 <0.01
吸气 10min	46±6	2.26 >0.05	84±14*	9.61 <0.01	85±10*	12.19 <0.01
吸气 20min	44±8	1.23 >0.05	82±9*	12.42 <0.01	85±8*	12.85 <0.01
吸气 30min	43±7	1.50 >0.05	36±4*	5.55 <0.01	54±5*	5.96 <0.01
吸气幅度						
吸气前	0.06±0.02		0.05±0.01		0.06±0.02	
吸气 1min	0.04±0.04	1.27 >0.05	0.21±0.03*	16.33 <0.01	0.25±0.04*	14.04 <0.01
吸气 10min	0.08±0.04	2.23 >0.05	0.21±0.04*	12.95 <0.01	0.24±0.03*	16.18 <0.01
吸气 20min	0.04±0.03	1.57 >0.05	0.24±0.05*	12.53 <0.01	0.25±0.06*	10.49 <0.01
吸气 30min	0.05±0.03	1.79 >0.05	0.03±0.01*	6.04 <0.01	0.07±0.02	2.04 >0.05

与缺氧前相比, * $P < 0.01$



a: 缺氧前生理盐水+低 O_2 组 b: 缺氧后 30min 生理盐水+低 O_2 组
c: 缺氧前阿米洛利+低 O_2 组 d: 缺氧后 30min 阿米洛利+低 O_2 组

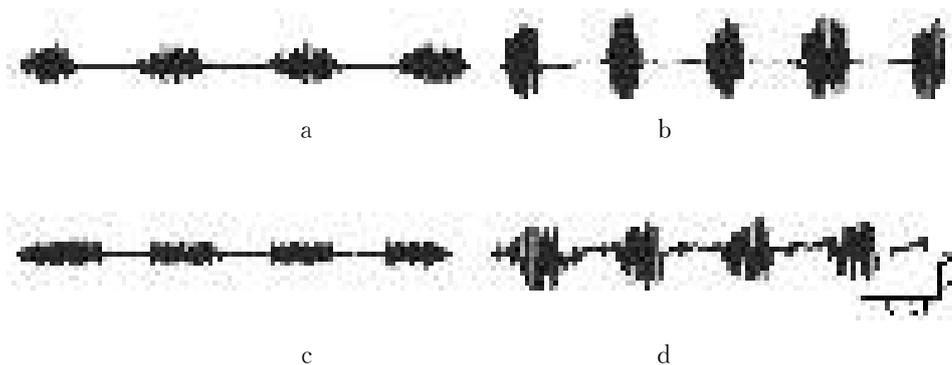
图 1 脑室内注射阿米洛利对缺氧性呼吸抑制的影响

表2 脑室内注射阿米洛利对气管插管侧管吸入纯 CO₂ 气体大鼠所致呼吸兴奋的影响

组别	时间	TI/S	TE/S	RF/次·min ⁻¹	Amp/mV
生理盐水+高 CO ₂ 组	吸入 CO ₂ 前	0.64±0.06	0.77±0.04	43±8	0.05±0.01
	吸入 CO ₂ 1min	0.29±0.04*	0.31±0.04*	101±7*	0.24±0.05*
	<i>t</i>	12.49	23.22	16.11	12.23
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
阿米洛利+高 CO ₂ 组	吸入 CO ₂ 前	0.62±0.03	0.71±0.04	45±5	0.04±0.02
	吸入 CO ₂ 1min	0.44±0.06*	0.49±0.04*	65±11*	0.16±0.03*
	<i>t</i>	8.15	12.01	4.72	10.01
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与吸入 CO₂ 前相比,* P<0.01表3 脑室内注射阿米洛利对气管插管侧管吸入纯 CO₂ 气体大鼠所致呼吸反应变化率的影响

组别	吸气时程	呼气时程	呼吸频率	吸气幅度
生理盐水+高 CO ₂ 组	54.69±11.56	59.74±12.11	134.88±18.33	380.00±20.31
阿米洛利+高 CO ₂ 组	29.03±9.97*	30.99±9.34*	44.44±11.71*	300.00±18.79*
<i>t</i>	4.75	5.32	11.76	8.18
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与生理盐水+高 CO₂ 组相比,* P<0.01a:吸入 CO₂ 前生理盐水+高 CO₂ 组 b:吸入 CO₂ 1min 生理盐水+高 CO₂ 组
c:吸入 CO₂ 前阿米洛利+高 CO₂ 组 d:吸入 CO₂ 1min 阿米洛利+高 CO₂ 组图2 脑室内注射阿米洛利对气管插管侧管吸入纯 CO₂ 大鼠所致呼吸兴奋的影响

3 讨论

3.1 阿米洛利对缺氧性呼吸抑制的保护作用

本文结果显示,缺氧后大鼠先表现为呼吸兴奋,缺氧后 30min 表现为明显的抑制。缺氧后呼吸兴奋的产生主要是刺激外周化学感受器所致,而缺氧后呼吸抑制效应则是由呼吸中枢神经元缺氧性损害所致。对于阿米洛利+缺氧组动物,缺氧后 30min 较缺氧前尚未表现出明显的抑制,提示阿米洛利对缺氧性呼吸抑制有保护作用。Miyake 等^[4]研究表明,在培养的大鼠皮层神经元,缺氧可使 ASICs 亚型 ASIC_a 表达明显增多;将大鼠大脑中动脉闭塞后,大鼠皮层神经元表达 ASIC_a 也明显

增多,提示 ASIC_a 与神经元的缺氧性损害有关。缺氧性呼吸抑制时,脑干孤束核、斜方体核等呼吸相关核团 ASIC_a 表达明显增多,提示 ASIC_a 是导致呼吸中枢神经元缺氧性损害,进而导致呼吸抑制的重要原因^[5]。缺氧可引起组织酸化,进而诱导 ASIC_a 的开放,引起大量 Na⁺ 内流,导致细胞水肿,同时 ASIC_a 对 Ca²⁺ 也有较大通透性,加重细胞内钙超载,引起神经元坏死。因此,ASIC_a 被认为是非谷氨酸依赖性钙毒性神经元损伤的主要参与者^[6]。阿米洛利是 ASICs 非特异性阻断剂,因此能减弱 ASIC_a 引起的缺氧性损害,进而对缺氧性呼吸抑制发挥保护作用。

(下转第 250 页)

处方,实验结果显示优选得到的最佳制备工艺条件是可行的,为新型药物传输系统的研究提供一定的依据,适合进一步研究。

参考文献:

- [1] Lu B. Study on polymersome micelles and niosomes as the vehicle of medicational system[J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2008, 27(1): 1-3.
- [2] Yang R, Wang X J. Progress of study on niosomes[J]. Chinese Journal of Pharmaceutics, 2008, 6(3): 124-129.
- [3] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into the in vitro cutaneous delivery of resicle tretinoin[J]. Int J Pharm, 2006, 311(1): 11-19.
- [4] 杜美菊, 凌翠霞, 李娜, 等. 甲氨蝶呤的制备和体外释放性能

研究[J]. 应用化工, 2005, 34(12): 757-759.

- [5] Zhao X Y, Li H, Zhang B X, et al. Preparation and evaluation of non-ionic surfactant based vesicle as a new drug delivery system[J]. International Journal of Pharmaceutical Research, 2007, 34(6): 439-441.
- [6] Zhang W T, Huang Q B, Lin L F, et al. Determination of the entrapment efficiency of docetaxol liposome[J]. Chinese Journal of Hospital pharmacy, 2008, 28(14): 1179-1181.
- [7] 张波, 王慧云, 全先高. 非离子表面活性剂囊泡作为头孢匹胺钠药物载体的研究[J]. 济宁医学院学报, 2011, 34(4): 236-239
- [8] 袁悦, 王红霞, 刘岩, 等. 类脂囊泡作为 5-氟尿嘧啶药物载体的研究[J]. 分子科学学报, 2010, 12(6): 420-423.

(收稿日期 2015-06-15)

(上接第 246 页)

3.2 阿米洛利减弱高浓度 CO₂ 引起的呼吸兴奋作用

本文结果显示,吸入高浓度 CO₂ 1min 大鼠表现为呼吸兴奋。吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋的效应可通过刺激外周化学感受器和中枢化学感受器两条途径发挥作用。脑室内注射阿米洛利后,减弱了由吸入高浓度 CO₂ 引起的呼吸兴奋作用,即减弱了刺激中枢化学感受器的作用,故吸入高浓度 CO₂ 刺激中枢化学感受器引起的呼吸兴奋效应可能与 ASICs 有关。宋娜娜等^[7]研究表明,在下丘脑外侧区注射阿米洛利,再注射酸化的人工脑脊液能阻断注射酸化人工脑脊液引起的呼吸兴奋效应。脑室内预注射阿米洛利也能阻断脑室内注射酸化人工脑脊液引起的呼吸兴奋效应^[8]。以上结果提示,ASICs 是使中枢化学感受器受到刺激进而产生呼吸效应的关键通道,由于吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋可通过刺激外周和中枢化学感受器两条途径发挥作用。因此,脑室内注射阿米洛利可阻断中枢化学感受器的作用,但刺激外周化学感受器的作用依然可以显现出来。因此,脑室内注射 ASICs 阻断剂阿米洛利不能完全阻断吸入高浓度 CO₂ 引起呼吸兴奋效应,只能减弱此效应。

综上所述,ASICs 阻断剂阿米洛利既对缺氧性呼吸抑制有保护作用,也可以减弱吸入高浓度

CO₂ 引起的呼吸兴奋效应,提示 ASICs 在缺氧和高 CO₂ 引起的呼吸效应中具有重要的调节作用。在上述两种呼吸反应中,究竟是 ASICs 哪种亚型发挥作用,还需更为深入地研究。

参考文献:

- [1] 李丽,王超,张静. 缺氧性呼吸抑制的中枢机制[J]. 医学综述, 2007, 13(17): 1341-1343.
- [2] 李丽. 酸敏感的离子通道研究[J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 5(1): 79-82.
- [3] 杜芸兰,朱立菁,陆生地,等. 酸敏感离子通道 1 α 介导缺氧皮质神经元损伤及相关机制的探讨[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(5): 516-519.
- [4] Miyake T, Nishiwaki A, Yasukawa T, et al. Possible implications of acid-sensing ion channels in ischemia-induced retinal injury in rats[J]. Jpn J Ophthalmol, 2013, 57(1): 120-125.
- [5] 李丽,刘文彦,刘莹. 丹红注射液延迟缺氧性呼吸抑制的发生及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(6): 1123-1126.
- [6] 向军,唐宇平,蔡定芳. 非谷氨酸依赖的钙毒性机制在急性脑缺血损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1224-1228.
- [7] 宋娜娜. 中枢酸敏感离子通道对呼吸的调节及机制研究[D]. 上海:复旦大学, 2010.
- [8] 李丽,刘文彦,高波. 酸敏感离子通道在中枢化学感受器呼吸调节中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8): 1400-1403.

(收稿日期 2015-06-02)