

総説

ラット頸動脈小体におけるチロシン水酸化酵素および血管内皮細胞増殖因子の発現

若井 淳

要約

頸動脈小体においてチロシン水酸化酵素 (TH) および血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は化学受容の調節に関与している可能性がある。本研究ではラット生体が低酸素暴露, 高二酸化炭素暴露, 低酸素と高二酸化炭素の同時暴露された際にTHおよびVEGFがどのような発現変化を示すか定量的リアルタイムRT-PCRおよび免疫組織化学を用いて調べ, 低酸素暴露により両分子とも短時間で発現増加を示すが, その増加はCO₂によって抑制されることが明らかとなった。この結果から, CO₂は頸動脈小体における低酸素暴露時の呼吸反射の調節因子であると考えられる。

キーワード：頸動脈小体, 低酸素, 高二酸化炭素, チロシン水酸化酵素, 血管内皮細胞増殖因子

緒言

頸動脈小体 (carotid body : CB) はO₂とCO₂の両方に感受性を持つが, 多くの研究者はCO₂受容よりO₂受容を主に研究している。長時間の低酸素 (Hypoxia) 暴露は適応反応を誘起し, さらにCBにおいて抑制性の作用を示すドーパミンの増加を起こすことが知られている [1-4]。ヒトとマウスの主細胞においてドーパミンD₂受容体の発現が確認されており, ドーパミンはネガティブフィードバック的にD₂受容体を介して電位依存性Ca²⁺チャネルを抑制し, 興奮性の作用を示すアセチルコリンの放出を低下させると考えられている [5]。主細胞に

おけるドーパミンの放出および含有量の増加は2-28日間のHypoxia暴露で観察された [6-8]。CBにおいて24時間以内の短時間Hypoxia暴露および1週間以上の長時間Hypoxia暴露によりドーパミンの律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase : TH) はmRNAレベルとタンパクレベルの両方で発現増加することが知られている [6, 8-10]。ゆえにTH発現の増加はHypoxiaに暴露された動物のCBにおけるドーパミン放出に関与していると考えられる。

長時間のHypoxia暴露 (2週間以上) を行ったラットにおいて, CBは主細胞の増加と血管拡張により肥大化することが知られている [3,

11]. WangとBisgard [8] はCBの血管内皮細胞は慢性的なHypoxia暴露（1-7日間）によって分裂するとbromodeoxyuridine (BrdU) 標識法の結果から考察している。さらに血管拡張には血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) の関与が報告されている [12]。VEGFはいくつかの臓器において血管拡張だけではなく血管新生についても重要な役割を担うと考えられている [13, 14]。ラット主細胞においてVEGF免疫反応は1日以上Hypoxia暴露によって有意に増強することが報告されている [15]。ゆえにVEGFはHypoxia暴露された動物のCBにおける血管拡張と血管新生に関与している可能性がある。一方、CBの形態学的な変化と呼吸反射を含む化学反射はHypoxia暴露、高二酸化炭素 (Hypercapnia) 暴露、低酸素と高二酸化炭素の同時 (Hypercapnic hypoxia) 暴露のそれぞれで異なることが知られている [1, 2]。前述のようにHypoxia暴露は血管拡張と主細胞の増加を誘起する [3, 11]。Hypercapnic hypoxia暴露を行ったラットのCBも肥大化するが、これは主細胞の増加のみによるものであり、血管拡張は観察されない [3, 4, 11]。Hypercapnia暴露を行ったラットのCBでは形態学的な変化は観察されなかった [4]。呼吸反射に関しては、一般的にHypoxiaは呼吸頻度の増加を主に引き起こし、Hypercapniaは呼吸深度の増加を主に引き起こすことが報告されている [1]。さらにHirakawaら [2] の報告によると、Hypercapnic hypoxia暴露は、HypoxiaあるいはHypercapniaの単独暴露より強い呼吸反射を引き起こすことが知られている。形態学的変化に加えてCBからの求心性神経である頸動脈洞枝 (carotid sinus nerve : CSN) の発火もHypoxia暴露、Hypercapnia暴露あるいはHypercapnic hypoxia暴露によって異なることがラットとネコを用いた実験から示唆されている [16, 17]。

以上の通り、長時間のHypoxia暴露により

THおよびVEGFの発現増加を示すことが知られているが、短時間のHypoxia暴露によってもこれらの分子は発現増加を示す可能性がある。さらに、Hypoxia暴露、Hypercapnia暴露、Hypercapnic hypoxia暴露によって化学受容反応は異なることから、これら分子の発現はCO₂によって影響を受けている可能性がある。そこで、我々はTHおよびVEGFのmRNA発現は24時間までの短時間Hypoxia暴露によって影響を受けており、さらにHypoxia暴露、Hypercapnia暴露、Hypercapnic hypoxia暴露によって異なるという仮説を立てた。本研究ではTHおよびVEGF mRNAがHypoxia暴露、Hypercapnia暴露、Hypercapnic hypoxia暴露によってどのような発現変化を示すかをリアルタイムRT-PCR法を用いて調べ、さらにTHに関しては免疫蛍光法を用いてタンパクレベルでの発現変化の評価を行った。

方 法

実験にはWistarラット (雄・180-200g, 各実験n=6) を用いて行い、以下の4つの異なる条件で0, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間の暴露実験を行った: 1) 低酸素暴露群 (Hypoxia; 10% O₂ かつ < 1% CO₂), 2) 高二酸化炭素暴露群 (Hypercapnia; 20% O₂ かつ 10% CO₂), 3) 低酸素と高二酸化炭素の同時暴露群 (Hypercapnic hypoxia; 10% O₂ かつ 10% CO₂), 4) コントロール群 (Chamber control; 20% O₂ かつ < 1% CO₂)。

定量的リアルタイムRT-PCRを行うため、暴露実験後にジエチルエーテルを用いて腹大動脈から放血殺を行い、CBを採取し液体窒素で保存した。total RNAをCBから磁気ビーズ法 (MELT total RNA extraction kit, Ambion, Austin, TX) を用いて抽出し、TH mRNA発現およびVEGF mRNA発現の解析はSYBRグリーンを用いたリアルタイムRT-PCR法によって測定した (Power SYBR Green RNA-to-

表1 定量的リアルタイムRT-PCRに用いたプライマー

mRNA (Accession number)	Primer sequences	Position	Product length (bp)
TH (NM_012740)	5'-GGAGCTGAAGGCTTATGGTG-3' (sense) 5'-CATTGAAGCTCTCGGACACA-3' (antisense)	1163-1182 1310-1329	167
VEGF (NM_031836)	5'-AATGATGAAGCCCTGGAGTG-3' (sense) 5'-ATGCTGCAGGAAGCTCATCT-3' (antisense)	259-278 353-372	114
18S rRNA (X03205)	5'-CCTGCGGCTTAATTTGACTC-3' (sense) 5'-AACTAAGAACGGCCATGCAC-3' (antisense)	1230-1249 1328-1347	118

CTTM 1-Step Kit, Applied Biosystems, Forster City, CA). 用いたプライマーは表1に示した. TH mRNA発現およびVEGF mRNA発現はそれぞれTH mRNA濃度/18S rRNA濃度, VEGF mRNA濃度/18S rRNA濃度×10,000で表した. 統計学的解析はKruskal-Wallis testおよびpost-hoc testとしてBonferroni testを用いて行った.

各暴露実験を行ったCBにおけるTH免疫反応の蛍光強度の変化を間接蛍光抗体法を用いて解析した. また, 暴露実験を行っていないラットCBにおけるTH免疫反応の変化も調べた. ラットはペントバルビタール (15mg/kg, 腹腔内投与) で麻酔し, 心臓からリンゲル液 (200ml) を流した後, 0.5%ピクリン酸加4%パラホルムアルデヒドin 0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4, 200ml) を灌流して固定を行った. 固定後, CBが含まれるように頸動脈の分岐部を採取し, クリオスタットを用いて10 μ mの凍結切片を作成した. 切片は一次抗体に抗TH抗体 (1:2,000, Chemicon International, Temecula, CA) を, 2次抗体にAlexa488標識抗マウスロバ血清 (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて免疫組織化学を行った. 撮影したTH免疫蛍光の画像は256階調のグレースケールに変換し, コンピュータ上でNIH Scion Image Program (Scion Corp., Frederick, MD) という画像解析ソフトを用いて主細胞の細胞集塊のグレースケール濃度 (0-255) の平均を測定することでTH蛍光強度を測定した. 各暴露群において

少なくとも20の主細胞の細胞集塊をランダムに測定した.

成 績

Hypoxia暴露を行ったラットのCBにおけるTH mRNA発現の経時変化は次の通りである: 0時間 (暴露なし; TH mRNA/18s rRNA, 0.0017 \pm 0.0003), 2時間 (0.0037 \pm 0.0020), 4時間 (0.0148 \pm 0.0071), 6時間 (0.0136 \pm 0.0037), 8時間 (0.0175 \pm 0.0056), 12時間 (0.0101 \pm 0.0041), 24時間 (0.0049 \pm 0.0015; 図1A). TH mRNA発現は4時間 (約6.6倍), 6時間 (約6.0倍; vs. 0時間), 8時間 (約7.8倍) 暴露において0, 2および24時間暴露と比較して有意な発現増強が観察された (図1A). 8時間暴露した際のTH mRNA発現は12時間暴露に比べても有意に高い発現を示した (図1A). また, 12時間暴露を行ったラットのCBは0および24時間暴露と比較して有意なTH mRNA発現増加を示した (図1A).

Hypercapnia暴露を行ったラットのCBにおけるTH mRNA発現は以下の通りである: 2時間 (0.0021 \pm 0.0010), 4時間 (0.0030 \pm 0.0006), 6時間 (0.0030 \pm 0.0008), 8時間 (0.0032 \pm 0.0012), 12時間 (0.0027 \pm 0.0017), 24時間 (0.0032 \pm 0.0008; 図1B). Hypercapnia暴露によるラットCBにおけるTH mRNA発現は有意な変化を示さないことが明らかとなった (図1B).

Hypercapnic hypoxia暴露によるTH mRNA

の発現変化は次の通りである：2時間 (0.0032 ± 0.0015), 4時間 (0.0069 ± 0.0029), 6時間 (0.0067 ± 0.0040), 8時間 (0.0072 ± 0.0036), 12時間 (0.0124 ± 0.0054), 24時間 (0.0052 ± 0.0015; 図 1 C). 発現増加のピークは12時間暴露であった (図 1 C). 12時間暴露の際の TH mRNA発現は 0, 2 および 24時間暴露と比較して有意に高い発現増加を示した (図 1 C).

Chamber control実験群における TH mRNA発現は各暴露時間において有意な変化は観察されなかった：2時間 (0.0028 ± 0.0005), 4時間 (0.0029 ± 0.0017), 6時間 (0.0042 ± 0.0017), 8時間 (0.0037 ± 0.0011), 12時間 (0.0035 ±

0.0013), 24時間 (0.0035 ± 0.0015; 図 1 D).

全ての実験群のラットCBにおいてTH陽性主細胞は観察された (図 2). Hypoxia実験群のラットCBにおけるTH免疫蛍光反応のグレースケール濃度は84.5 ± 12.7 (0時間; 暴露なし), 86.8 ± 12.8 (6時間暴露), 122.0 ± 9.5 (12時間暴露) および127.1 ± 8.8 (24時間暴露) であった. Hypoxia実験群におけるTH免疫反応は12時間 (vs.0時間, 約1.4倍; vs.6時間, 約1.4倍) および24時間 (vs.0時間, 約1.5倍; vs.6時間, 約1.5倍) で0 および6時間と比較して有意な増強が観察された (図 3). Hypercapnia実験群におけるTH免疫反応は暴露時間による変化

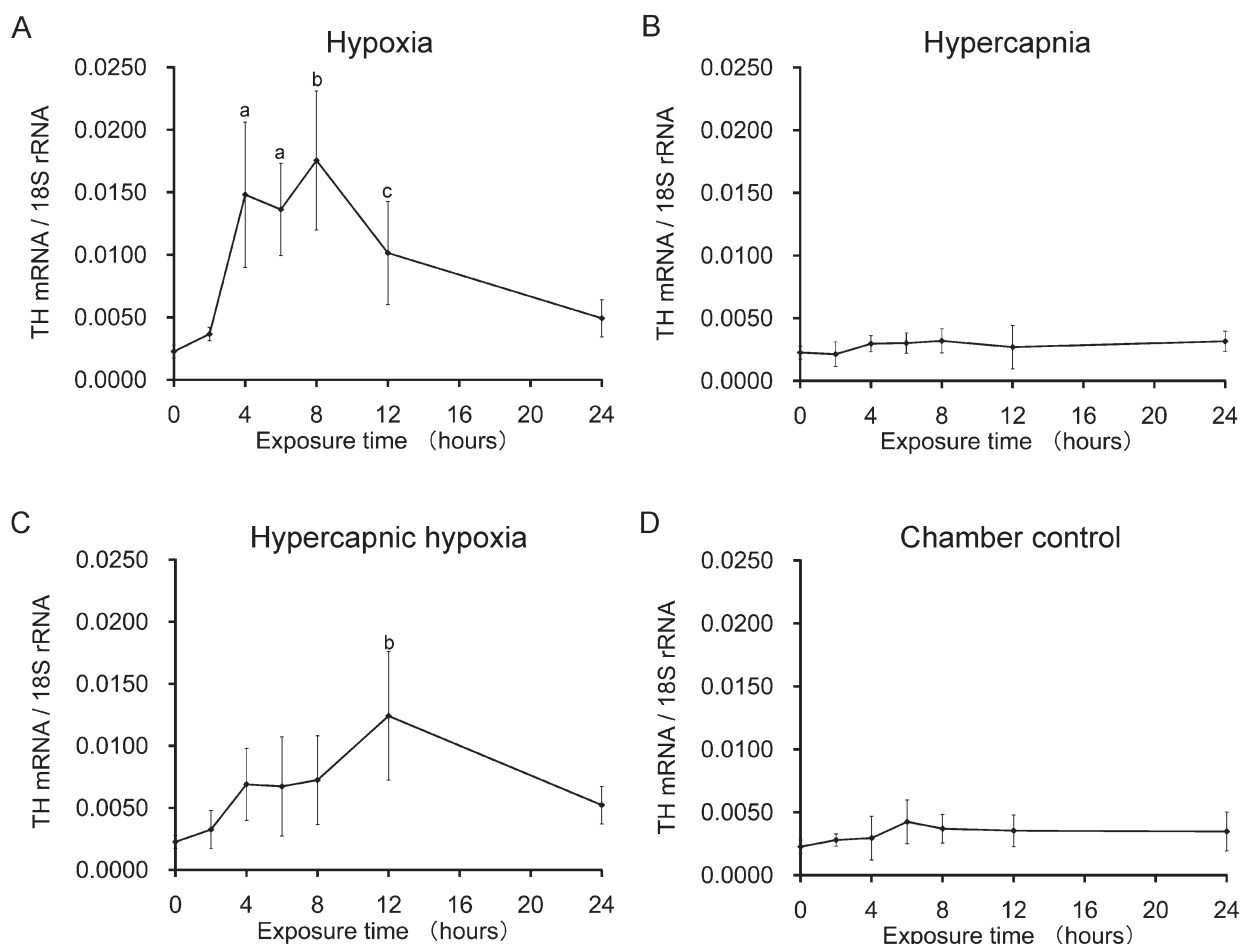


図 1

4 種のガス暴露を行ったラットのCBにおける TH mRNA発現の経時変化を示したグラフ。

(A) Hypoxia暴露による TH mRNAの強い発現増加は 4 – 8 時間で観察された。

(B) Hypercapnia暴露による TH mRNAの発現変化は観察されなかった。

(C) Hypercapnic hypoxia暴露によって TH mRNAは12時間で強い発現増加を示した。

(D) コントロールガスによる TH mRNAの発現変化は観察されなかった。

^a $p < 0.05$ vs. 0, 2, 12および24時間, ^b $p < 0.05$ vs. 0, 2および24時間, ^c $p < 0.05$ vs. 0および24時間。

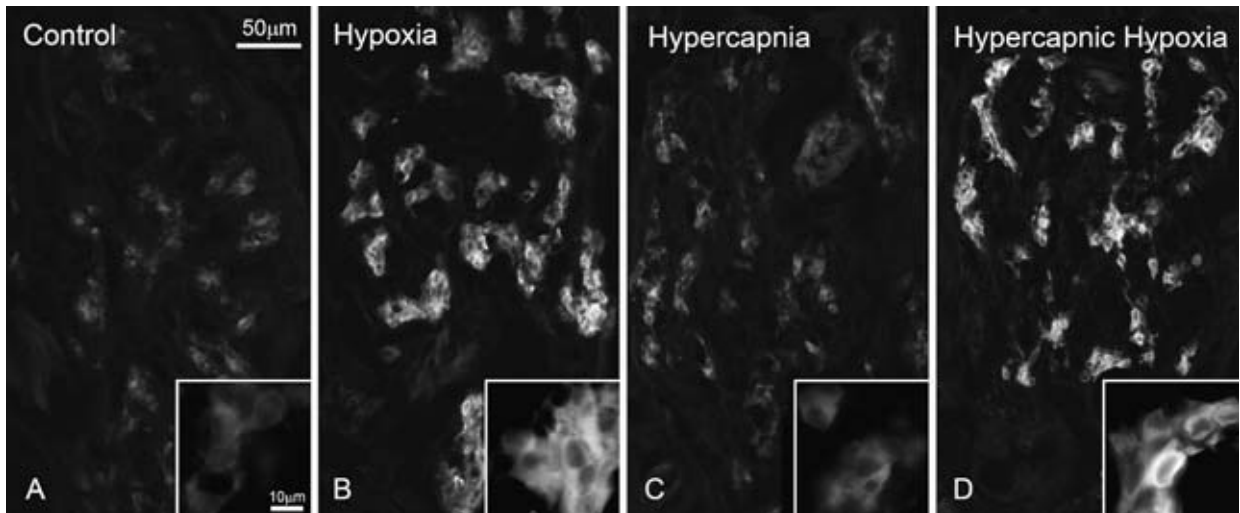


図 2

CB主細胞におけるTH免疫反応の写真。

- (A) 暴露なし
- (B) 24時間のHypoxia暴露
- (C) 24時間のHypercapnia暴露
- (D) 24時間のHypercapnic hypoxia暴露

TH免疫反応はHypoxia暴露およびHypercapnic hypoxia暴露によって増強された。Hypercapnia暴露によるTH免疫反応の変化は観察されなかった。

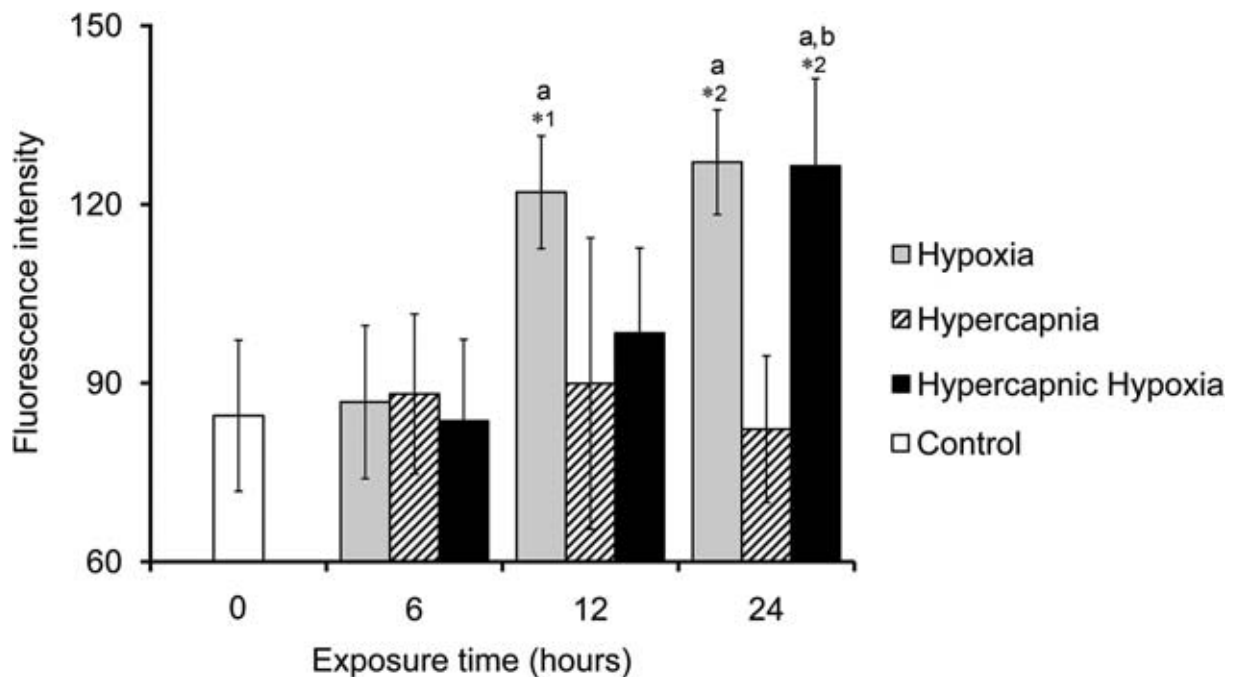


図 3

暴露なし (白)、Hypoxia暴露 (灰色)、Hypercapnia暴露 (斜線)、Hypercapnic hypoxia暴露 (黒) を行ったラットCBにおけるTH免疫反応の蛍光強度の経時変化を示したグラフ。TH免疫反応の蛍光強度はHypoxia暴露により12および24時間で強い増強を、Hypercapnic hypoxia暴露により24時間で強い増強を示した。^a $p < 0.05$ vs. controlおよび6時間、^b $p < 0.05$ vs. 12時間、^{*1} $p < 0.05$ vs. HypercapniaおよびHypercapnic hypoxia、^{*2} $p < 0.05$ vs. Hypercapnia。

が観察されなかった（6時間， 88.2 ± 13.4 ；12時間， 89.9 ± 24.5 ；24時間， 82.3 ± 12.3 ；図3）。24時間のHypercapnic hypoxia暴露によるTH免疫反応（ 126.4 ± 14.7 ）は0時間（約1.5倍）および6時間（ 83.6 ± 13.7 ，約1.5倍），12時間（ 98.4 ± 14.3 ，約1.5倍）と比べて有意な発現増強を示すことが明らかとなった（図3）。

Hypoxia実験群，Hypercapnia実験群，Hypercapnic hypoxia実験群間で各暴露時間におけるTH免疫反応の比較を行った（図3）。12時間のHypoxia暴露によるTH免疫反応はHypercapnia暴露およびHypercapnic hypoxia暴露と比較して有意な増強を示すことがわかった（図3）。さらに，24時間におけるHypoxia実験群とHypercapnic hypoxia実験群のTH免疫反応はHypercapnia実験群と比較して有意に高い増強を示すことが明らかとなった（図3）。

Hypoxia暴露を行ったラットのCBにおけるVEGF mRNA発現の経時変化は以下の通りである：0時間（暴露なし； 0.44 ± 0.07 ），2時間（ 2.08 ± 0.05 ），4時間（ 2.60 ± 0.41 ），6時間（ 1.00 ± 0.09 ），8時間（ 1.36 ± 0.09 ），12時間

（ 0.73 ± 0.09 ），24時間（ 0.71 ± 0.22 ；図4A）。VEGF mRNA発現は2時間暴露（vs.0時間，約4.7倍）で0，6，12，24時間暴露と比較して有意な発現増加を示した（図4A）。4時間のHypoxia暴露によるVEGF mRNA発現は0，6，8，12および24時間暴露と比べて有意な発現増加を示すことが明らかとなった（図4A）。

Hypercapnia暴露を行ったラットのCBにおけるVEGF mRNA発現は次の通りである：2時間（ 0.68 ± 0.25 ），4時間（ 0.55 ± 0.01 ），6時間（ 0.64 ± 0.28 ），8時間（ 0.70 ± 0.33 ），12時間（ 0.62 ± 0.34 ），24時間（ 0.56 ± 0.09 ；図4B）。Hypercapnia暴露によるVEGF mRNA発現は変化を示さないことがわかった（図4B）。

Hypercapnic hypoxia実験群におけるVEGF mRNA発現の経時変化は以下に示す通りである：2時間（ 1.02 ± 0.06 ），4時間（ 1.19 ± 0.36 ），6時間（ 1.03 ± 0.22 ），8時間（ 1.53 ± 1.10 ），12時間（ 1.05 ± 0.29 ），24時間（ 0.80 ± 0.15 ；図4C）。Hypercapnic hypoxiaの8時間暴露で0時間と比べて約3.4倍の有意な発現増加が観察された（図4C）。

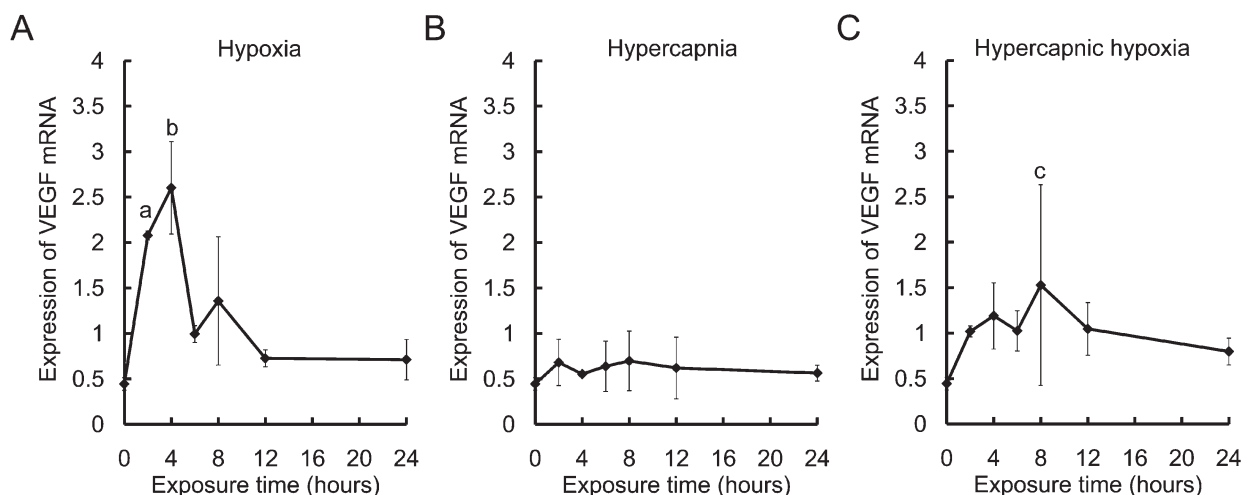


図4

3種の実験群で行ったラットのCBにおけるVEGF mRNA発現の経時変化を示したグラフ。

(A) Hypoxia暴露によるVEGF mRNAの強い発現増加は2および4時間で観察された。

(B) Hypercapnia暴露によるVEGF mRNAの発現変化は観察されなかった。

(C) Hypercapnic hypoxia暴露によってVEGF mRNAは8時間で強い発現増加を示した。

^a $p < 0.05$ vs. 0, 6, 12および24時間，^b $p < 0.05$ vs. 0, 6, 8, 12および24時間，^c $p < 0.05$ vs. 0時間。

考 察

定量的RT-PCRのデータはTH mRNAは短時間のHypoxia暴露によって発現増加を示すものである(4, 6, 8時間暴露)。この結果はCzyzyk-Krzeskaらの報告[9]に一致するものである。Hypoxia暴露によるTH mRNA発現の増加は低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor: HIF)によるものであることが知られている[7]。CBから分離した主細胞においてRoyら[18]はHIF-1 α 発現が増加することを示している。それゆえ、今回の研究におけるTH mRNAの発現増加はHypoxia暴露によって発現増加されたHIF-1 α の誘導によるものと考えられる。

Hypoxia暴露によるTH mRNAの強い発現増加は一時的なものであったが、TH免疫反応は12時間を過ぎても強い発現増強を維持した。Hypoxia暴露によって増加されたTH mRNA発現はTHタンパクの発現増加を誘導することが知られている[19]。TH免疫反応の増強はTHタンパクの増加によるものと考えられ、それゆえTH mRNA発現はTHタンパクが十分な量に達すると定常量に戻ると考えられる。Condeら[20]はラットCBにおけるドーパミン含量はHypoxia暴露によって増加することを明らかにした。Welshら[21]はドーパミンがCBを通して呼吸抑制を行うことを示した。加えてドンペリドンによる末梢のD2受容体の抑制によりHypoxia感受性が増強されることが知られている[22]。本研究の結果およびこれらの報告からHypoxia暴露によって誘導されたTHは過剰な呼吸増加を防ぐためドーパミン合成を促したと考えられる。

TH mRNA発現と同様にVEGF mRNA発現も2-4時間という短時間のHypoxia暴露によって増加することが明らかとなった。VEGFはFlk-1と結合することで血管拡張を行うことが知られている[14]。さらに、VEGFはNOの合成および放出を増加させる血管拡張因子の一つ

であることも知られている[14]。今回の実験におけるVEGF mRNAの増加はHypoxia誘導性の血管拡張を担うために観察されたと考えられる。また、VEGFは血管新生の際にも重要な役割を担っている[13]。24時間以上のHypoxia暴露を行ったラットCBにおいて血管内皮細胞が増加することがBrdU標識法を用いた研究によって明らかとなっている[8]。したがって、VEGFはラットCBにおいてHypoxia誘導性の血管新生にも関与している可能性がある。THと同様にVEGF発現もHIF-1 α によって誘導されることが知られている[23]。そのため、Hypoxia暴露によるVEGF mRNA発現もHIF-1 α によって誘導され、さらにタンパクレベルでの増加が起きている可能性がある。しかしながら、TH mRNAとVEGF mRNAの発現増加が確認され始める時間はそれぞれ4時間、2時間という異なる結果を示した。最近の研究でPC12細胞においてHypoxia誘導性TH mRNA発現はHIF-1 α ではなくアデノシンA2A受容体によって誘導されているとの報告がある[24]。よってHIF-1 α に加えてA2A受容体もHypoxia暴露の際のTH mRNA発現を誘導する可能性がある。そのため、TH mRNAとVEGF mRNAの発現に時間差ができたと考えられる。

HypercapniaはHypoxiaと同様にCB主細胞の活性化、CSN放出の増加および呼吸反射の増強を誘起する[18, 23, 25]。しかしながらHypercapnia暴露によるCBにおけるカテコラミン放出は観察されない[26]。本研究においてHypercapnia暴露はTH mRNA発現およびTH免疫反応に影響を与えなかった。したがって、CO₂はCBにおけるドーパミンの合成および放出を誘導しないことが示唆された。一般的にCO₂はCBではなく主に中枢化学受容細胞で感知されることが知られている[27]。Hypercapnia暴露による呼吸反射はCBによる急性応答と中枢化学受容細胞による長期応答の二相に分かれているとの報告がある[28]。加えて

Nakanoら [29] はドンペリドンによる呼吸促進はHypoxiaでは観察されるがHypercapniaでは観察されないと報告している。Hypercapnia暴露によってTH発現が変化しないため、ドーパミンはCO₂に対する急性応答にほとんど関与していないと考えられる。CBにおけるVEGF mRNA発現もHypercapnia暴露による変化を示さなかった。慢性的なHypercapnia暴露によるCBでの主細胞の増加および血管拡張は観察されない [4]。そのためVEGF mRNA発現も起こらなかったと考えられる。

Hypercapnic hypoxia暴露実験の結果からCO₂はHypoxia誘導性のTH mRNA発現を抑制することが示唆された。HypoxiaによるTH免疫反応の増強はHypercapniaによって遅延されることが観察された。この遅延はおそらくHypercapniaによるHypoxia誘導性TH mRNA発現増加の抑制に起因するものと考えられる。THはドーパミン合成を調節し、ドーパミンは主細胞の脱分極を抑制する [8]。ZhangとNurse [25] はHypercapnic hypoxia暴露時の主細胞の活性はHypoxia暴露あるいはHypercapnia暴露を行ったときより高いことを報告している。さらに、主細胞の細胞内Ca²⁺濃度の増加も同様であることが知られている [30]。したがって、Hypercapnic hypoxia暴露時のTHの抑制はCBにおける化学反射の増加を誘導するものであることが示唆された。また、Hypercapnic hypoxia暴露による強い呼吸増加はCBと中枢化学受容細胞の両方の作用に起因するものと考えられる。以上より、CO₂はHypoxia誘導性TH mRNA発現の調節を行う重要な因子であることが示唆された。

Hypercapnic hypoxia暴露を行ったラットCBにおいてVEGF mRNA発現は8時間で増加するが、その発現増加はHypoxia暴露と比較すると低いものであることがわかった。VEGF mRNAの発現増加は観察されるが、長時間のHypercapnic hypoxia暴露によるラットCBの

血管拡張は起こらないことが知られている [3]。Hypercapnic hypoxia暴露によるVEGF mRNAの発現増加は血管拡張ではなく血管新生のために起こったと考えられる。Melchionnaら [31] はHIF-1 α の活性は虚血によるアシドーシスによって血管内皮細胞で抑制されることを報告した。Hypercapnic hypoxia暴露によって血液pHは低下することが知られているため、CB主細胞におけるHIF-1 α はアシドーシスにより抑制される可能性がある [11]。以上より、ラットCBのTH mRNAおよびVEGF mRNA発現は、CO₂誘導性の細胞内アシドーシスによってHIF-1 α が抑制されるため、Hypoxia暴露と比べてHypercapnic hypoxia暴露の際は抑制されていると考えられる。CBの血管はPaO₂およびPaCO₂の情報を主細胞に伝えるため重要な役割を担っている。各暴露実験群間のTH発現の違いはそれぞれの呼吸反射が違うことを反映しているものであり、同様にVEGF発現の違いはCBにおける血管拡張および血管新生による呼吸反射の違いを示していると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、多大な御指導と御助言を賜りました岩手大学 山本欣朗教授、谷口和之教授、木崎景一郎准教授ならびに山田美鈴准教授に深く感謝いたします。

引用文献

- [1] Garcia A, Cherniack NS: Integrated phrenic activity in hypercapnia and hypoxia, *Anesthesiology*, 28, 1029-1035 (1967)
- [2] Hirakawa H, Nakamura T, Hayashida Y: Effect of carbon dioxide on autonomic cardiovascular responses to systemic hypoxia in conscious rats, *Am J Physiol*, 273, 747-754 (1997)
- [3] Kusakabe T, Hirakawa H, Oikawa S

- et al*: Morphological changes in the rat carotid body 1, 2, 4, and 8 weeks after the termination of chronically hypocapnic hypoxia, *Histol Histopathol*, 19, 1133-1140 (2004)
- [4] Kusakabe T, Hirakawa H, Oikawa S *et al*: Effect of carbon dioxide on the structure of the carotid body, *Adv Exp Med Biol*, 580, 55-61 (2006)
- [5] Kim DK, Prabhakar NR, Kumar GK : Acetylcholine release from the carotid body by hypoxia : evidence for the involvement of autoinhibitory receptors, *J Appl Physiol*, 96, 376-383 (2004)
- [6] Hui AS, Striet JB, Gudelsky G *et al*: Regulation of catecholamines by sustained and intermittent hypoxia in neuroendocrine cells and sympathetic neurons, *Hypertension*, 42, 1130-1136 (2003).
- [7] Powell FL, Fu Z : HIF-1 and ventilatory acclimatization to chronic hypoxia, *Respir Physiol Neurobiol*, 164, 282-287 (2008)
- [8] Wang ZY, Bisgard GE : Chronic hypoxia-induced morphological and neurochemical changes in the carotid body, *Microsc Res Tech*, 59, 168-177 (2002)
- [9] Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE *et al*: Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia, *J Neurochem*, 58, 1538-1546 (1992)
- [10] Kato K, Yamada M, Yamamoto Y : Short-term hypoxia increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in rat carotid body, *J Histochem Cytochem*, 58, 839-846 (2010)
- [11] Kusakabe T, Matsuda H, Hayashida Y : Hypoxic adaptation of the rat carotid body, *Histol, Histopathol*, 20, 987-997 (2005)
- [12] Tipoe GL, Fung ML : Expression of HIF-1 α , VEGF and VEGF receptors in the carotid body of chronically hypoxic rat, *Respir Physiol Neurobiol*, 138, 143-154 (2003)
- [13] Folkman J, Shing Y : Angiogenesis, *J Biol Chem*, 267, 10931-10934 (1992)
- [14] Grover TR, Zenge JP, Parker TA *et al*: Vascular endothelial growth factor causes pulmonary vasodilation through activation of the phosphatidylinositol-3-kinase-nitric oxide pathway in the late-gestation ovine fetus, *Pediatr Res*, 52, 907-912 (2002)
- [15] Tipoe GL, Fung ML : Expression of HIF-1 α , VEGF and VEGF receptors in the carotid body of chronically hypoxic rat, *Respir Physiol Neurobiol*, 138, 143-154 (2003)
- [16] Fukuda Y, Sato A, Trzebski A : Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats, *J Auton Nerv Syst*, 19, 1-11 (1986)
- [17] Lahiri S, DeLaney RG : Stimulus interactions in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent, *Respir Physiol*, 24, 249-266 (1975)
- [18] Roy A, Baby SM, Wilson DF *et al*: Rat carotid body chemosensory discharge and glomus cell HIF-1 α expression in vitro: regulation by a common oxygen sensor, *Am J*

- Physiol Integr Comp Physiol, 293, 829-836 (2007)
- [19] Feinsilver SH, Wong R, Rayabin DM : Adaptation of neurotransmitter synthesis to chronic hypoxia in cell culture, Biochim Biophys Acta, 928, 56-62 (1987)
- [20] Conde SV, Obeso A, Rigual R *et al* : Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing , J Neurochem, 99, 711-723 (2006)
- [21] Welsh MJ, Heistad DD, Abboud FM : Depression of ventilation by dopamine in man. Evidence for an effect on the chemoreceptor reflex, J Clin Invest, 61, 708-713 (1978)
- [22] Kressin NA, Nielsen AM, Laravuso R *et al* : Domperidone-induced potentiation of ventilatory responses in awake goats, Respir Physiol, 65, 169-180 (1986)
- [23] Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV *et al* : Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1, Mol Cell Biol, 16, 4604-4613 (1996)
- [24] Gammella E, Cairo G, Tacchini L : Adenosine A2A receptor but not HIF-1 mediates tyrosine hydroxylase induction in hypoxic PC12 cells, J Neurosci Res, 88, 2007-2016 (2010)
- [25] Zhang M, Nurse CA : CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons : role of ATP and Ach, J Neurophysiol, 92, 3433-3445 (2004)
- [26] Hellstrom S, Pequignot JM, Dahlqvist Å : Catecholamines in the carotid body are unaffected by hypercapnia, Neurosci Lett, 97, 280-284 (1989)
- [27] Lahiri S, Forster 2nd RE : CO₂/H⁺ sensing : peripheral and central chemoreception, Int J Biochem Cell Biol, 35, 1413-1435 (2003)
- [28] Smith CA, Rodman JR, Chenuel BJA *et al* : Response time and sensitivity of the ventilatory response to CO₂ in unanesthetized intact dogs : central vs. peripheral chemoreceptors, J Appl Physiol, 100, 13-19 (2006)
- [29] Nakano H, Lee SD, Farkas GA : Dopaminergic modulation of ventilation in obese Zucker rats, J Appl Physiol, 92, 25-32 (2002)
- [30] Roy A, Rozanov C, Mokashi A *et al* : PO₂-PCO₂ stimulus interaction in [Ca²⁺] _i and CSN Activity in the adult rat carotid body, Respir Physiol, 122, 15-26 (2000)
- [31] Melchionna R, Romani M, Ambrosino V *et al* : Role of HIF-1 α in proton-mediated CXCR4 down-regulation in endothelial cells, Cardiovasc Res, 86, 293-301 (2010)