

Rac 对失血性休克大鼠血管反应性的调节作用

李涛, 杨光明, 徐竞, 明佳, 刘良明^{*} (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 目的 探讨 Rac 在失血性休克大鼠血管反应性调节中的作用。方法 采用 SD 大鼠复制休克模型, 取离体血管环, 观察休克早期和晚期血管反应性的变化以及 Rac 激动剂和特异性抑制剂对休克早期和晚期血管反应性的影响; 通过酶消化法培养原代血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC), 采用双室培养方式分别观察 VSMC 缺氧 10 min 和 90 min 后 VSMC 对去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的收缩反应性变化, 同时观察 Rac 活性调节剂对缺氧后 VSMC 收缩反应性的影响。结果 在休克早期和短暂缺氧后, 离体血管环和 VSMC 对 NE 收缩反应性均有所升高, Rac 的激动剂血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)可部分降低休克早期或短暂缺氧后血管反应性, Rac 特异性抑制剂 NSC 23766 可拮抗由 PDGF 所引起的血管反应性的变化, 而在休克晚期或长时间缺氧后, 离体血管环和 VSMC 对 NE 收缩反应性明显降低, NSC 23766 对休克晚期或长时间缺氧所致血管反应性降低有升高作用。结论 休克后血管反应性呈双相变化, 休克早期升高, 休克晚期降低, Rac 参与了休克血管反应性的调节。

关键词: 失血性休克; Rac; 血管反应性; 大鼠

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2009)08-0607-04

The Effects of Rac on Vascular Reactivity Following Hemorrhagic Shock in Rats

LI Tao, YANG Guangming, XU Jing, MING Jia, LIU Liangming^{*} (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of Rac on vascular reactivity following hemorrhagic shock(HS) in rats. **METHODS** The superior mesenteric artery(SMA) from hemorrhagic shock rats was adopted to assay the vascular reactivity via observing the contraction initiated by norepinephrine(NE) with isolated organ perfusion system. With transwell culture, the contractile response of VSMC to NE after hypoxia (10 min, 90 min, after hypoxia). Meanwhile, the effect of the PDGF and NSC 23766, Rac activity regulating agents, on vascular reactivity was observed. **RESULTS** The contractile response of SMA to NE at early shock (immediate after shock) and VSMC contractility to NE after transient hypoxia (10min after hypoxia) were significantly increased, Rac agonist PDGF the decreased reactivity of SMA and VSMC to NE at early shock or 10 min after hypoxia. The effect of PDGF was abolished by NSC 23766. But in the late period of shock or after prolonged hypoxia, the contractile response of SMA and VSMC to NE was decreased, Rac agonist PDGF had no influence on decreasing vascular reactivity in the later period of shock or after 90 min hypoxia, while its inhibitor NSC 23766 increased the contractile response of SMA and VSMC to NE. **CONCLUSION** Vascular reactivity is biphasic change following hemorrhagic shock, Rac takes part in the regulation of biphasic vascular reactivity regulation after shock.

KEY WORDS: hemorrhagic shock; Rac; vascular reactivity; rat

严重创伤/休克失代偿期常出现血管的低反应性, 血管低反应的存在是导致休克后期血压难以回升和患者死亡的主要原因之一。现有研究显示失血性休克血管低反应性发生机制有血管平滑肌细胞膜受体失敏、膜超极化和本实验室提出的血管平滑肌细胞(Vascular Smooth muscle cell, VSMC)肌肉收缩蛋白对钙离子浓度降低即钙失敏^[1-2]。基础研究显示, 小 G 蛋白 RhoA 与 Rac 之间存在活性平衡^[3], Rac

对 RhoA 活性具有调节作用^[4]。本实验室前期研究发现 RhoA 可通过 Rho kinase 参与休克血管反应性的调节^[5], Rac 是否参与了血管反应性的调节, 目前尚不清楚。本研究拟采用失血性休克肠系膜动脉和缺氧培养 VSMC, 观察 Rac 对休克不同时期血管反应性的调节作用。

1 材料与方法

1.1 动物处理

基金项目: 国家自然科学基金(30600228); 国家 973 计划(2005CB522601); 教育部创新团队基金(IRT0712); 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5078)

作者简介: 李涛, 女, 博士, 副研究员 ^{*}通信作者: 刘良明, 男, 博士, 研究员

Tel: (023)68757421 E-mail: Liangmingliu@yahoo.com

SD 大鼠, ♀ ♂ 各半, 体重(211.3 ± 15.4)g[由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK(渝)2007-0005], 实验前禁食、自由饮水, 实验当日用戊巴比妥钠麻醉, 右侧股动脉及股静脉分别供观察血压, 放血用。稳定 10 min, 经股动脉插管 10 min 内放血至血压 40 mmHg, 根据实验设计维持不同时间。正常对照组仅插管, 不放血, 不输液。

1.2 离体血管环反应性测定

根据实验设计休克后活杀大鼠, 取肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA), 清除周围结缔组织, 制作成 2~3 mm 长的血管环用于血管反应性测定。随机取出 8 只作为正常对照组, 其余制作休克模型, 分为休克即刻组, 休克 2 h 组, 休克即刻+PDGF 组, 休克即刻+NSC 23766 组, 休克即刻+NSC 23766+PDGF 组, 休克 2 h+PDGF 组, 休克 2 h+NSC 23766 组, 休克 2 h+NSC 23766+PDGF 组。正常组大鼠直接活杀取 SMA, 制作血管环。

血管反应性测定: 将所取 SMA 血管环挂于注有 K-H 液的离体器官灌流槽的浴槽中, 持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体, 给预初张力 0.5 g, 25 $^{\circ}C$ 恒温孵育 2 h, 每 20 min 换液 1 次, 待张力曲线平稳后, 测定血管环对去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)的反应性。血小板衍生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)或 NSC 23766 组分别用 PDGF($20 \mu g \cdot L^{-1}$)或 NSC 23766 ($10 \mu mol \cdot L^{-1}$)(Sigma, 美国)预孵育休克 2 h SMA 10 min; NSC 23766+PDGF 组用 NSC 23766($10 \mu mol \cdot L^{-1}$)预孵育休克 2 h SMA 10 min, 再用 PDGF($20 \mu g \cdot L^{-1}$)预孵育 10 min; 分别观察血管环对 NE 的收缩反应。血管环对 NE 的反应性用 NE 的 $pD_2(-\log[EC_{50}])$ 和最大收缩力(E_{max})以及量-效曲线评价。

1.3 原代 VSMC 分离, 双室培养及收缩反应测定

取正常大鼠肠系膜动脉, 清除周围脂肪组织和内膜, 用 I 型胶原酶($2 mg \cdot mL^{-1}$)和牛血清白蛋白($2 mg \cdot mL^{-1}$)37 $^{\circ}C$ 消化 40 min, 制成细胞悬液, 在 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养^[6]。

将原代提取 VSMC 传代至第 3~5 代用于实验。实验分为正常对照组, 缺氧 10 min 组, 缺氧 90 min 组, 缺氧 10 min + PDGF 组, 缺氧 10 min + NSC 23766 组, 缺氧 10 min+NSC 23766+ PDGF 组, 缺氧 90 min+PDGF 组, 缺氧 90 min+NSC 23766 组, 缺氧 90 min+NSC 23766+ PDGF 组。VSMC 接种于 Transwells。根据实验要求缺氧 10 min 或 90 min,

缺氧后在上室分别加入荧光素标记的牛血清白蛋白和 NE, 分别在加 NE 后不同时间从下室取培养液测定荧光强度, 以反映 VSMC 收缩反应。根据所取液体荧光素的累计数占总荧光素的百分率计算结果。PDGF 和 NSC 23766 组分别加入 PDGF($20 \mu g \cdot L^{-1}$)和 NSC 23766($10 \mu mol \cdot L^{-1}$)预孵育 10 min 观察 VSMC 收缩反应; NSC 23766 与 PDGF 合用组分别用 NSC 23766 预孵 10 min, 再用 PDGF 孵育 10 min 后观察 VSMC 收缩反应性。

1.4 VSMC 缺氧处理

VSMC 接种于 Transwell 培养 72 h 后, 移入缺氧培养罐内, 密闭, 将缺氧气体(95% N_2 和 5%的 CO_2)以 $10 L \cdot min^{-1}$ 速度充入 10 min, 而后夹闭 5 min, 继续充气, 重复 3 次达到完全缺氧后开始计时。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间采用 t 检验进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 Rac 对休克早期 SMA 血管反应性的影响

与正常对照组相比, 休克即时, SMA 对 NE 的量-效曲线明显左移, E_{max} 显著性增加($P < 0.05$), 休克即时 SMA 血管环收缩力在 $NE 1 \times 10^{-4}$, 1×10^{-5} , $1 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$ 水平均显著高于正常对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。Rac 激动剂 PDGF 可降低休克即时 SMA 对 NE 的反应性, 与休克即时组相比, E_{max} 明显降低($P < 0.05$), 量效曲线明显右移, Rac 特异性抑制剂 NSC 23766 对休克即时 SMA 血管环的收缩反应性无明显影响, NSC 23766 可拮抗由 PDGF 所引起的血管反应性的升高, 结果见图 1。

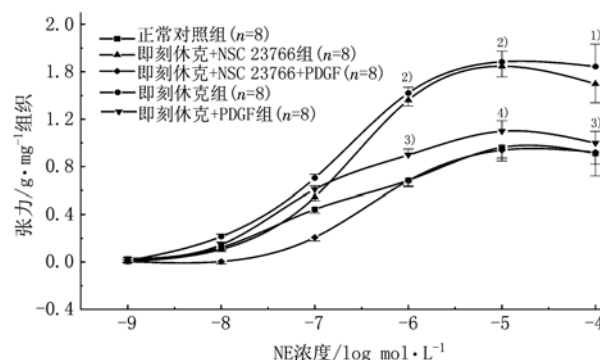


图 1 Rac 对失血性休克早期 SMA 血管反应性的影响

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与休克即刻组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Fig 1 Effect of Rac on vascular reactivity following shock immediately

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; compared with shock immediately group, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

2.2 Rac 对休克晚期 SMA 血管反应性的影响

与正常对照组相比, 休克 2 h 时, SMA 对 NE 的量-效曲线明显右移, $E_{\max}$ 显著性降低($P<0.01$)。Rac 激动剂 PDGF 对休克 2 h SMA 血管环的收缩反应性无明显影响, NSC 23766 可升高休克 2 h 组 SMA 对 NE 收缩反应性, $E_{\max}$ 显著性升高($P<0.01$), 量效曲线明显左移, 血管收缩力在 $NE\ 1\times 10^{-5}, 1\times 10^{-6}\ mol\cdot L^{-1}$ 水平均显著高于休克 2 h 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 结果见图 2。

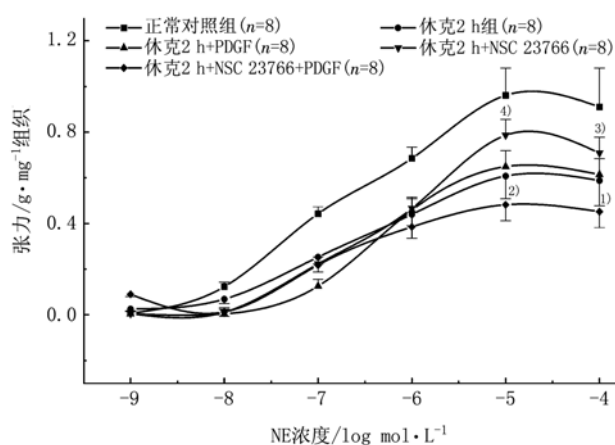


图 2 Rac 对失血性休克晚期 SMA 血管反应性的影响

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与休克 2 h 组比较, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

Fig 2 Effect of Rac on vascular reactivity following shock 2 h
Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with shock 2 h group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

2.3 Rac 对缺氧 VSMC 收缩反应性的影响

缺氧 10 min 后, VSMC 对 NE 收缩反应性有所升高, 表现为荧光标记物对双室培养小室的渗透率发生变化, 但与正常对照组相比无显著性差异($P>0.05$), Rac 激动剂 PDGF 可降低缺氧 10 min VSMC 对 NE 的收缩反应性, PDGF 的作用可被 Rac 特异性抑制剂 NSC 23766 所拮抗。缺氧 90 min 后 VSMC 对 NE 收缩反应性明显降低, Rac 抑制剂 NSC 23766 升高 VSMC 对 NE 收缩反应性, Rac 激动剂 PDGF 进一步降低缺氧 90 min VSMC 对 NE 的收缩反应性, 结果见图 3。

3 讨论

严重创伤休克以及临床重症晚期均存在血管低反应性, 即血管对血管活性药物的反应降低或不反应, 血管低反应性是导致休克后期血压难以回升以及患者死亡的主要原因之一。研究表明, 在休克后不同时期血管反应性存在双相反应性, 即休克早期血管反应性升高, 休克晚期降低, 本实验室初步

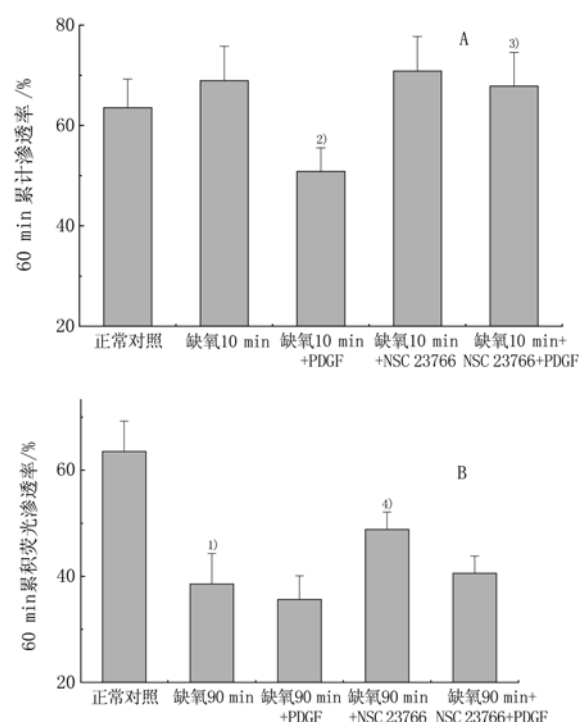


图 3 Rac 对缺氧早期(A)和缺氧晚期(B)VSMC 收缩反应性的影响

注: 与正常对照组荧光标记物 60 min 累计渗透率相比, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧 10 min 组荧光标记物 60 min 累计渗透率相比, ²⁾ $P<0.05$; 与缺氧 10 min + PDGF 组荧光标记物 60 min 累计渗透率相比, ³⁾ $P<0.05$; 与缺氧 90 min 组荧光标记物 60 min 累计渗透率相比, ⁴⁾ $P<0.05$

Fig 3 Effect of Rac on VSMC contractility to NE following hypoxia 10 min(A) and 90 min(B)

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with hypoxia 10 min group, ²⁾ $P<0.05$; compared with hypoxia 10 min + PDGF group, ³⁾ $P<0.05$; compared with hypoxia 90 min group, ⁴⁾ $P<0.05$

的研究显示, Rho kinase 参与了休克双相血管反应性变化的调节。RhoA 与 Rac 之间存在活性平衡^[4], Rac 可通过不同途径调节 RhoA 的活性, 在休克条件下 Rac 是否参与了休克血管反应性的调节, 目前尚不清楚。

本研究结果显示, 在休克早期和短暂缺氧后, 离体血管环和 VSMC 对 NE 收缩反应性均有所升高, Rac 的激动剂 PDGF 可部分降低休克早期或短暂缺氧后血管反应性。而在休克晚期或长时间缺氧后, 离体血管环和 VSMC 对 NE 收缩反应性明显降低, Rac 激动剂 PDGF 对休克晚期或长时间缺氧所致血管反应性的降低无明显影响, Rac 特异性的抑制剂 NSC 23766 可升高休克晚期的血管反应性。研究结果说明休克后血管反应性呈双相变化, 休克早期升高, 休克晚期降低, Rac 参与了休克管反应性的调节。

基础研究显示 Rac 对 RhoA 活性具有调节作用。Rac 活化可促进活性氧(reactive oxygen species, ROS)

生成,产生 O^{2-} ,抑制 LMW-PTP(低分子量蛋白酪氨酸磷酸酶)的活性,由于 LMW-PTP 可引起 P190RhoGAP 磷酸化而使活性增加,最终导致 Rho 的活性降低^[4]。此外,而 Rac 还可通过下游蛋白 PAK(p-21 activated kinase)使肌球蛋白轻链激酶 (MLCK)磷酸化而活性降低,降低肌球蛋白轻链磷酸化水平。因此推测 Rac 一方面可能通过其下游蛋白 PAK 调节 MLCK 活性调节休克血管反应性,同时基础研究提示 Rho 的下游蛋白 Rho kinase 可通过调节 VSMC 钙敏感性来调节休克血管反应性,因此推测 Rac 也可能通过调节 RhoA 活性来调节休克 VSMC 钙敏感性进而调节其血管反应性,但其具体机制如何,尚需进一步研究。

REFERENCES

- [1] XU J, LIU L M. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and its regulation following hemorrhagic shock [J]. Shock, 2005, 23(6): 576-581.
- [2] LI T, LIU J C, LIU L M. Role of MLC20 phosphorylation in the regulation of Rho kinase to VSMC contractile response following hypoxia [J]. Chin J Crit Care Med(中国急救医学), 2008, 28(1): 34-38.
- [3] BURRIDGE K, WENNERBERG K. Rho and Rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167-179.
- [4] TSUJI T, ISHIZKI T, OKAMOTO M, et al. Rock and mDial antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts [J]. J Cell Biol, 2002, 157(5): 819-830.
- [5] LANG R J, HARVEY J R, MCPHEE G J, et al. Nitric oxide and thiol reagent modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} (BK_{Ca}) channels in myocytes of the guinea-pig taenia caeci [J]. J Physiol, 2000, 525(2): 363-376.
- [6] ESSLER M, AMANO M, KRUSE H J, et al. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells [J]. J Biol Chem, 1998, 274(34): 21867-21874.

收稿日期: 2008-06-24