

Tie-2 介导 Ang-1、Ang-2 调节大鼠失血性休克血管反应性双相变化的作用研究

徐竞, 杨光明, 李涛, 刘良明^{*} (第三军医大学大坪医院野战外科研究所二室, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

摘要: 目的 观察 Tie-2 在血管生成素-1(angiotensin-1, Ang-1)、血管生成素-2(angiotensin-2, Ang-2)调节失血性休克血管反应性双相变化中的作用。方法 采用离体微血管环张力测定技术和 Western blot 技术, 观察失血性休克后不同时间点肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)中 Tie-2 蛋白表达和磷酸化变化、抑制 Tie-2 对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期和晚期血管反应性作用的影响, 以及给予 Ang-1 和 Ang-2 后缺氧的血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)混合细胞中 Tie-2 蛋白表达和磷酸化变化, 并观察抑制 Tie-2 对缺氧早期和晚期的混合细胞 NO 含量的影响。结果 ①肠系膜上动脉 Tie-2 蛋白表达和酪氨酸磷酸化在正常时很低, 失血性休克后逐渐增高, 在休克早期(休克 10 min), Tie-2 蛋白表达变化不大, 但酪氨酸磷酸化已明显增高($P<0.01$); 随着休克时间延长, Tie-2 蛋白表达和酪氨酸磷酸化均进一步显著增高($P<0.01$)。②Tie-2 抑制剂可降低缺氧 10 min 的血管高反应性(NE 的 $E_{\max}$ 由 13.479 mN 降低至 10.122 mN, $P<0.05$), 并显著抑制 Ang-1 对缺氧 10 min 血管反应性的维持作用($E_{\max}$ 由 15.283 mN 降低至 10.253 mN, $P<0.01$); Tie-2 抑制剂可改善缺氧 4 h 的血管低反应性(NE 的 $E_{\max}$ 由 5.875 mN 增高至 8.003 mN, $P<0.05$), 并显著拮抗 Ang-2 进一步降低缺氧 4 h 血管反应性的作用($E_{\max}$ 由 3.444 mN 增高至 7.643 mN, $P<0.01$)。③缺氧 10 min 时, 降低血管高反应性的 Ang-2 可降低 Tie-2 磷酸化, 使其由 0.040 3 降低至 0.012 3($P<0.01$); 缺氧 4 h 时, 恢复血管低反应性的 Ang-1 可降低 Tie-2 蛋白表达, 使其由 0.227 6 降低至 0.085 1($P<0.01$), 也可以降低 Tie-2 磷酸化, 使其由 0.143 7 降低至 0.035 9($P<0.01$)。④NO 含量在缺氧早期显著增高, Ang-2 和 Tie-2 抑制剂显著抑制其增高($P<0.01$); 缺氧晚期 NO 含量较正常对照组增高得更为显著, Ang-1 和 Tie-2 抑制剂可抑制其增高($P<0.01$)。结论 Ang-1、Ang-2 通过 Tie-2 受体调节大鼠失血性休克血管反应性双相变化。

关键词: 失血性休克; 血管反应性; 双相变化; 血管生成素-1; 血管生成素-2; Tie-2

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)04-0343-06

Tie-2 Receptor Mediates the Regulation of Ang-1 and Ang-2 on the Biphasic Change of Vascular Reactivity after Hemorrhagic Shock in Rats

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

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the role of Tie-2 in the regulation of angiotensin-1(Ang-1) and angiotensin-2(Ang-2) on the biphasic change of vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats. **METHODS** The protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 in the superior mesenteric artery(SMA) after hemorrhagic shock were measured via Western blot technique, the effect of Tie-2 inhibitor on the vascular reactivity of SMA in the early (hyperreactivity) and late (hyporeactivity) period of hypoxia treated with Ang-1 and Ang-2 were observed via the isolated organ perfusion system, and the protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 in the hypoxia mixture of vascular endothelial cell(VEC) and vascular smooth muscle cell(VSMC) treated with Ang-1 and Ang-2 were measured via Western blot technique. Effect of Tie-2 on the NO concentration of VSMC and VEC mixture in the early and late hypoxia was detected by the NO kit. **RESULTS** ①The protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 in the SMA were low in normal control group, and were increased after hemorrhagic shock, the protein expression of Tie-2 was increased after 30 min shock ($P<0.01$), and the tyrosine phosphorylation of Tie-2 was increased after 10 min shock ($P<0.01$), both protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 were further increased as shock went on ($P<0.01$). ②Tie-2 inhibitor could decrease the vascular hyperreactivity in 10 min hypoxia (the $E_{\max}$

基金项目: 国家自然科学基金(30801189); 重庆市自然科学基金(CSTC, 2008BB5103)

作者简介: 徐竞, 女, 博士, 助理研究员 Tel: (023)68757420 E-mail: xujingzy1119@sina.com *通信作者: 刘良明, 男, 博士, 研究员 Tel: (023)68757421 E-mail: Liuliangming2002@yahoo.com

of NE was decreased from 13.479 mN to 10.122 mN, $P<0.05$), and repress the maintenance effect of Ang-1 on vascular reactivity in 10 min hypoxia (the $E_{\max}$ of NE was decreased from 15.283 mN to 10.253 mN, $P<0.01$); Tie-2 inhibitor could improve the vascular hyporeactivity in 4 h hypoxia (the $E_{\max}$ of NE was increased from 5.875 mN to 8.003 mN, $P<0.05$), and inhibit the decrease effect of Ang-2 on vascular reactivity in 4 h hypoxia (the $E_{\max}$ of NE was increased from 3.444 mN to 7.643 mN, $P<0.01$). ③At 10 min hypoxia, Ang-2 could decrease the tyrosine phosphorylation of Tie-2 from 0.040 3 to 0.012 3($P<0.01$), and at 4 h hypoxia, Ang-1 could decrease the protein expression of Tie-2 from 0.227 6 to 0.085 1($P<0.01$), and decrease the tyrosine phosphorylation of Tie-2 from 0.143 7 to 0.035 9($P<0.01$). ④The NO concentration in the cells mixture was significantly increased in the early hypoxia, and the increase could be inhibited by Ang-2 and Tie-2 inhibitor($P<0.01$); in the late hypoxia, the NO concentration was further increased, and could be inhibited by Ang-1 and Tie-2 inhibitor($P<0.01$). **CONCLUSION** Ang-1 and Ang-2 regulate the biphasic change of vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats through Tie-2 receptor.

KEY WORDS: hemorrhagic shock; vascular reactivity; biphasic change; angiopoietin-1; angiopoietin-2; Tie-2

本实验室前期研究发现,失血性休克后血管反应性呈早期增高和晚期降低的双相变化^[1],血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang-1)、血管生成素-2(angiopoietin-2, Ang-2)在失血性休克后的肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)中呈时间上的差异表达(Ang-1 的蛋白表达早期增高、晚期降低, Ang-2 的蛋白表达在休克后期逐渐增高),并参与了失血性休克血管反应性双相变化的形成^[2],但 Ang-1 和 Ang-2 差异表达调节休克血管反应性双相变化的机制如何尚不清楚。

根据基础研究,Ang-1 和 Ang-2 属于血管内皮细胞(vascular endothelia cell, VEC)特异的促血管新生因子家族——血管生成素家族,主要的受体是 VEC 中的 Tie-2,但 Ang-1 和 Ang-2 对 Tie-2 的作用相反,从而共同调节血管形成^[3]。但差异表达的 Ang-1 和 Ang-2 是否通过对 Tie-2 的不同作用导致休克血管反应性双相变化的形成目前尚不清楚。本实验采用离体微血管环张力测定技术和 Western blot 技术,观察失血性休克后不同时间点 SMA 中 Tie-2 蛋白表达和磷酸化变化、Tie-2 封闭抗体对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期和晚期血管反应性作用的影响,以及给予 Ang-1 和 Ang-2 后缺氧 VEC 和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)混合细胞中 Tie-2 蛋白表达和磷酸化变化,以探讨 Tie-2 在 Ang-1 和 Ang-2 调节失血性休克血管反应性双相变化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠,体质量 200~230 g,♀♂ 各半,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,实验动物合格证号为 SCXK(渝)2007-0005。

1.1.2 试剂 Ang-1、Ang-2、 β -actin 抗体均购自 Sigma-Aldrich 公司;酪氨酸磷酸化抗体(Millipore 公司);Tie-2 封闭抗体(Santa Cruz 公司);蛋白 G 琼脂糖、BCA 蛋白定量试剂盒均购自美国 Pierce 公司;细胞培养 DMEM/F12 培养基(美国 Hyclone 公司);小牛血清(奥地利 PAA 公司);一氧化氮检测试剂盒(Calbiochem 公司)。

1.2 方法

1.2.1 失血性休克后 Tie-2 的蛋白表达和磷酸化 取 SD 大鼠 48 只,实验前日禁食,实验当日采用 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,以及 500 U·mL⁻¹ 肝素钠抗凝,经右侧股动脉插管检测平均动脉压^[4],随机分为 6 组(每组 8 只):正常对照组、休克 10 min 组、休克 30 min 组、休克 1 h 组、休克 2 h 组、休克 4 h 组,采用本实验建立的方法制作维持不同时间的失血性休克大鼠模型(40 mmHg)^[4]。模型制作完成后,将大鼠处死,取 SMA 及其分支,常规方法提取组织总蛋白。

Tie-2 蛋白表达检测:取 SMA 组织总蛋白进行 Western blot^[2],条件为:8%SDS-PAGE 胶,5%奶粉封闭 1 h, Tie-2 抗体(1:200 稀释), β -actin 抗体(1:2 000 稀释),二抗(1:10 000 稀释)。Quantity One 软件分析蛋白条带,以 Tie-2/ β -actin 光密度值之比反映 Tie-2 蛋白表达水平。

Tie-2 酪氨酸磷酸化检测:取同一 SMA 组织总蛋白 300 μ g 加入 Tie-2 抗体(10 μ L),4 $^{\circ}$ C 摇床振荡过夜,再加入蛋白 G 琼脂糖 20 μ L,免疫沉淀收集蛋白 G-抗原-抗体免疫复合物。常规 Western blot,条件为:8% SDS-PAGE 胶,5%奶粉封闭 1 h 后,酪氨酸磷酸化抗体(1:2 000 稀释), β -actin 抗体(1:2 000 稀释),二抗(1:10 000 稀释)。以 Tie-2 磷酸化/ β -actin 光密度值之比反映 Tie-2 酪氨酸磷

酸化水平。

1.2.2 Tie-2 抑制剂对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期和晚期血管反应性的影响 取 SD 大鼠 104 只, 按“1.2.1”项下方法麻醉后, 取 SMA 一级分支血管环, 随机将 8 只 SMA 作正常对照组, 其余 SMA 分为 12 组(每组 8 只血管环): 缺氧 10 min 组、Ang-1+缺氧 10 min 组、Ang-2+缺氧 10 min 组、Tie-2 抑制剂+缺氧 10 min 组、Tie-2 抑制剂+Ang-1+缺氧 10 min 组、Tie-2 抑制剂+Ang-2+缺氧 10 min 组、缺氧 4 h 组、Ang-1+缺氧 4 h 组、Ang-2+缺氧 4 h 组、Tie-2 抑制剂+缺氧 4 h 组、Tie-2 抑制剂+Ang-1+缺氧 4 h 组、Tie-2 抑制剂+Ang-2+缺氧 4 h 组, Ang-1 和 Ang-2 的浓度均为 $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 采用 1:100 Tie-2 封闭抗体做 Tie-2 抑制剂。将血管浸入无糖 Krebs-Henseleit (K-H)液中, 然后进行不同时间的缺氧处理。具体缺氧方法为: 将血管置于缺氧罐中, 持续充入缺氧气体(5% CO_2 和 95% N_2)15 min 后夹闭 10 min, 反复 5 次, 最后一次充气后, 按各组要求分别夹闭 10 min 或 4 h 即可。

缺氧完成后, 将 SMA 血管环固定在微血管肌动描记仪上, 浸入 K-H 液中, 给予初始张力以及平衡微血管环, 直至张力曲线基本水平。采用累积浓度法检测微血管环对梯度浓度 NE 的反应性, 并作量-效曲线, 以 NE 的最大收缩力(E_{max})和量-效曲线评价血管反应性^[5]。

1.2.3 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早晚期血管反应性时 Tie-2 表达和磷酸化的变化 根据文献分别进行 VEC 和 VSMC 原代细胞培养^[6], 取第 3 代至第 5 代细胞按照细胞计数 1:1 比例混合。次日, 取 VEC 和 VSMC 混合细胞 20 瓶, 随机分作 5 组(每组 4 瓶): 正常对照组、缺氧 10 min 组、Ang-2+缺氧 10 min 组、缺氧 4 h 组、Ang-1+缺氧 4 h 组, 先在无血清培养基中按各组需要加入 Ang-1($200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)或 Ang-2($200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 然后进行不同维持时间的缺氧处理(缺氧方法同前)。最后酶消化法收集混合细胞, 提取细胞总蛋白。同上进行 Tie-2 蛋白表达和酪氨酸磷酸化检测。

1.2.4 Tie-2 对缺氧早期和晚期的混合细胞 NO 含量的影响 同上方法培养 VEC 和 VSMC 混合细胞 42 瓶, 随机分作 7 组(每组 6 瓶): 正常对照组、缺氧 10 min 组、Ang-2+缺氧 10 min 组、Tie-2 抑制剂+缺氧 10 min 组、缺氧 4 h 组、Ang-1+缺氧 4 h 组、Tie-2 抑制剂+缺氧 4 h 组, Ang-1、Ang-2 和

Tie-2 抑制剂的浓度同前, 缺氧处理后取细胞培养上清测定 NO 含量。

1.3 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件处理, 组内自身对照和配对实验数据用 t 检验, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为显著差异, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 失血性休克后 Tie-2 的蛋白表达和酪氨酸磷酸化

2.1.1 Tie-2 的蛋白表达 Tie-2 在正常时表达很低(与 β -actin 的比值为 0.047 8), 失血性休克后表达逐渐增高, 休克 30 min, 1, 2 和 4 h 时分别增高至 0.190 4, 0.207 0, 0.211 3 和 0.247 5($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.1.2 Tie-2 的磷酸化 正常对照组中 Tie-2 磷酸化水平很低, 与 β -actin 的比值为 0.011 5, 失血性休克后磷酸化水平逐渐增高, 休克 10, 30 min, 1, 2 和 4 h 时分别增高至 0.043 6, 0.062 3, 0.104 4, 0.135 7 和 0.152 5 ($P < 0.01$), 结果见图 1。

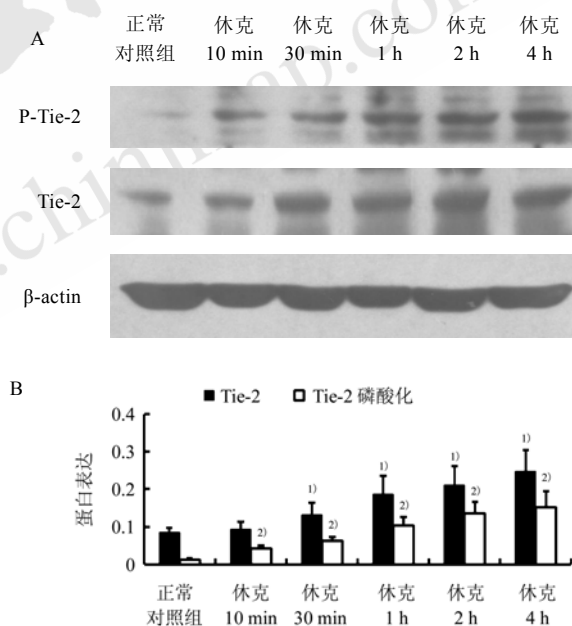


图 1 失血性休克后 Tie-2 的蛋白表达和酪氨酸磷酸化($n=4$)

A-电泳结果图; B-电泳结果光密度分析

与 Tie-2 蛋白表达正常对照比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 Tie-2 磷酸化正常对照比较, ²⁾ $P < 0.01$

Fig 1 The protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 after hemorrhagic shock($n=4$)

A-results of Western blot; B-analysis of Western blot

Compared with normal control group of Tie-2 protein expression, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with normal control group of Tie-2 phosphorylation, ²⁾ $P < 0.01$

2.2 Tie-2 抑制剂对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期和晚期血管反应性的影响

缺氧早期: Tie-2 抑制剂可降低缺氧早期的血管高反应性, 表现为与缺氧 10 min 组相比, Tie-2 抑制剂组的量-效曲线右移, NE 的 $E_{\max}$ 由 13.479 mN 降低至 10.122 mN ($P<0.05$)。Tie-2 抑制剂可显著拮抗 Ang-1 (200 ng·mL⁻¹) 对缺氧 10 min 血管反应性的维持作用, 表现为与单用 Ang-1 相比, 合用 Tie-2 抑制剂和 Ang-1 (200 ng·mL⁻¹) 可使 NE 的量-效曲线右移, $E_{\max}$ 由 15.283 mN 降低至 10.253 mN ($P<0.01$), 结果见图 2。

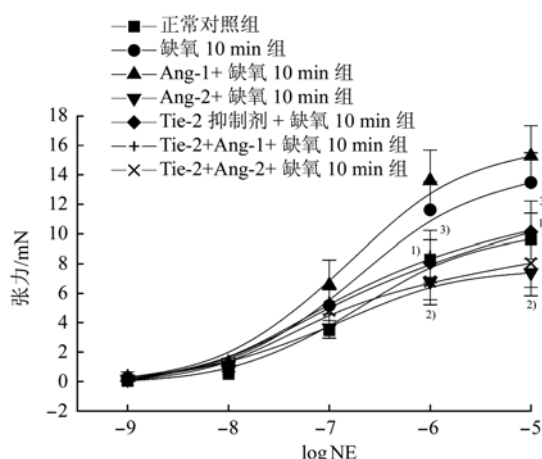


图2 Tie-2 抑制剂对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期血管高反应性的影响($n=8$)

与缺氧 10 min 组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 Ang-1+缺氧 10 min 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Fig 2 Effect of Tie-2 function blocking antibody on the regulation of Ang-1 and Ang-2 on the vascular reactivity in the early hypoxia($n=8$)

Compared with 10 min hypoxia group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with Ang-1+10min hypoxia group, ³⁾ $P<0.01$

缺氧晚期: Tie-2 抑制剂可改善缺氧晚期的血管低反应性, 表现为与缺氧 4 h 组相比, Tie-2 抑制剂组的量-效曲线左移, NE 的 $E_{\max}$ 由 5.875 mN 增高至 8.003 mN ($P<0.05$)。Tie-2 抑制剂可显著拮抗 Ang-2 (200 ng·mL⁻¹) 进一步降低缺氧 4h 血管反应性的作用, 表现为与单用 Ang-2 相比, 合用 Tie-2 抑制剂和 Ang-2 (200 ng·mL⁻¹) 可使 NE 的量-效曲线左移, $E_{\max}$ 由 3.444 mN 增高至 7.643 mN ($P<0.01$), 结果见图 3。

2.3 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早晚期血管反应性时 Tie-2 表达和磷酸化的变化

缺氧早期: 与正常对照相比, 缺氧 10 min 的 Tie-2 蛋白表达增高不明显, 但 Tie-2 磷酸化显著

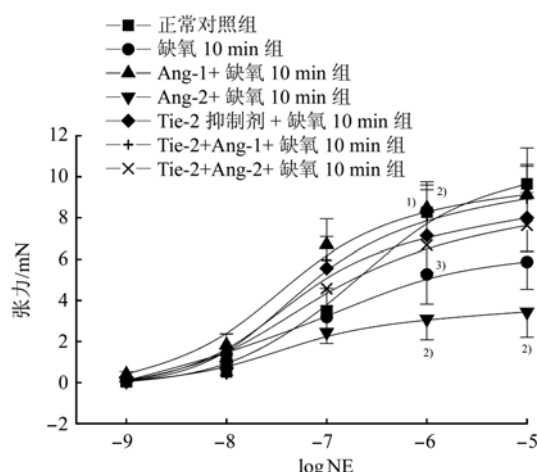


图3 Tie-2 抑制剂对 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧晚期血管低反应性的影响($n=8$)

与缺氧 4 h 组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与 Ang-2+缺氧 4 h 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Fig 3 Effect of Tie-2 function blocking antibody on the regulation of Ang-1 and Ang-2 on the vascular reactivity in the late hypoxia($n=8$)

Compared with 4 h hypoxia group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with Ang-2+4 h hypoxia group, ³⁾ $P<0.01$

增高(由 0.009 2 增高至 0.040 3)。降低缺氧 10 min 组血管高反应性的 Ang-2 可降低缺氧 10 min 的 Tie-2 磷酸化, 使 Tie-2 磷酸化由 0.040 3 降低至 0.012 3 ($P<0.01$)。

缺氧晚期: 与正常对照组相比, 缺氧 4 h 的 Tie-2 蛋白表达和磷酸化显著增高 ($P<0.01$)。恢复缺氧 4 h 组血管低反应性的 Ang-1 可降低缺氧 4 h 的 Tie-2 蛋白表达, 使其由 0.227 6 降低至 0.085 1 ($P<0.01$); 也可以降低缺氧 4 h 的 Tie-2 磷酸化, 使其由 0.143 7 降低至 0.035 9 ($P<0.01$), 结果见图 4。

2.4 Tie-2 对缺氧早期和晚期的混合细胞 NO 含量的影响

NO 含量在缺氧早期显著增高, 由正常对照的 0.892 3 增高至 8.811 2 $\mu\text{mol}\cdot 10^{-8}$ 细胞 ($P<0.01$), Ang-2 和 Tie-2 抑制剂可以显著抑制其增高, 使其分别降低至 5.121 3 和 2.739 4 $\mu\text{mol}\cdot 10^{-8}$ 细胞 ($P<0.01$); 缺氧晚期 NO 含量较正常对照组增高得更为显著, 至 30.594 1 $\mu\text{mol}\cdot 10^{-8}$ 细胞 ($P<0.01$), Ang-1 和 Tie-2 抑制剂使其分别降低至 15.207 9 和 9.366 7 $\mu\text{mol}\cdot 10^{-8}$ 细胞 ($P<0.01$), 结果见图 5。

3 讨论

Tie-2 是 Ang-1 和 Ang-2 的主要作用受体, 介导了 Ang-1 和 Ang-2 对血管形成的调节过程, Ang-1 可磷酸化并活化 Tie-2, 触发 VEC 和血管周

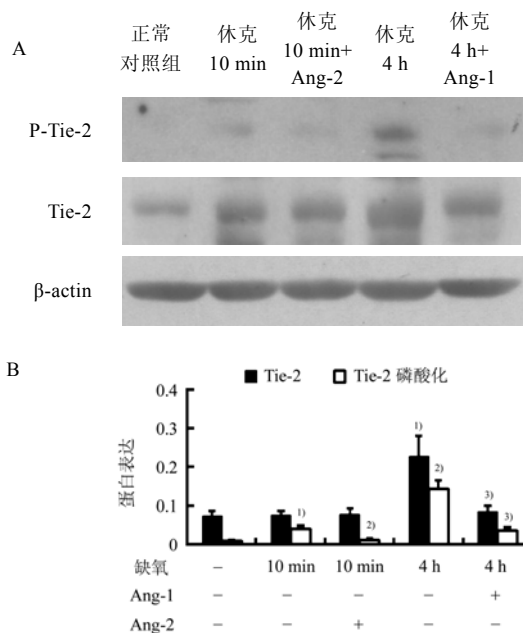


图 4 Ang-1 和 Ang-2 调节缺氧早期和晚期血管反应性时 Tie-2 表达和磷酸化的变化($n=4$)

A-电泳结果图; B-电泳结果分析

与 Tie-2 蛋白表达/磷酸化的正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 Tie-2 蛋白表达/磷酸化的缺氧 10 min 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与 Tie-2 蛋白表达/磷酸化的缺氧 4 h 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Fig 4 The protein expression and tyrosine phosphorylation of Tie-2 during the regulation of Ang-1 and Ang-2 on the vascular reactivity in the early and late hypoxia($n=4$)

A-results of Western blot; B-analysis of Western blot

Compared with normal control group of Tie-2 protein expression/phosphorylation, ¹⁾ $P<0.01$; compared with 10 min hypoxia group of Tie-2 protein expression/phosphorylation; ²⁾ $P<0.01$, compared with 4 h hypoxia group of Tie-2 protein expression/phosphorylation, ³⁾ $P<0.01$

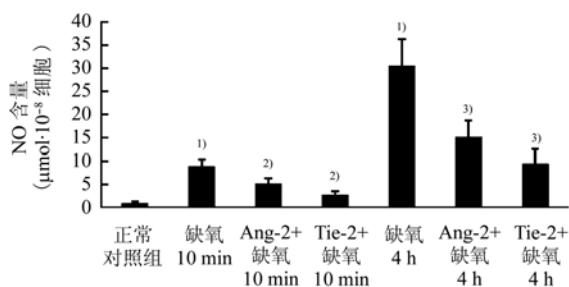


图 5 Tie-2 对缺氧早期和晚期的混合细胞 NO 含量的影响($n=6$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与缺氧 10 min 组比较, ²⁾ $P<0.01$; 与缺氧 4 h 组比较, ³⁾ $P<0.01$

Fig 5 Effect of Tie-2 on the NO concentration of VSMC and VEC mixture in the early and late hypoxia($n=6$)

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with 10 min hypoxia group, ²⁾ $P<0.01$; compared with 4 h hypoxia group, ¹⁾ $P<0.01$

细胞相互作用, 促成新生血管床的成熟与稳定; Ang-2 竞争性抑制 Ang-1 对 Tie-2 的活化, 阻断 Ang-1 的血管稳定作用, 破坏 VEC 和基质间的黏附, 促进血管基膜降解^[3]。但 Tie-2 受体是否介导

了 Ang-1 和 Ang-2 对休克血管反应性的调节, 并且由于 Ang-1 和 Ang-2 对 Tie-2 受体的不同作用, 导致休克血管反应性双相变化的形成, 目前尚不清楚。

本实验结果显示, 在缺氧早期, Tie-2 抑制剂可抑制血管高反应性, 并抑制 Ang-1 维持血管高反应性的作用; 且在 Ang-1 表达增高的休克早期, Tie-2 磷酸化也增高, 加入外源性 Ang-2 可降低 Tie-2 磷酸化, 并抑制血管高反应性, 提示休克早期 Ang-1 通过使 Tie-2 适度磷酸化来增高血管反应性。在缺氧晚期, Tie-2 抑制剂可恢复血管低反应性, 并抑制 Ang-2 的进一步降低血管反应性的作用; 而且在 Ang-2 表达增高的休克晚期, Tie-2 蛋白表达和磷酸化均进一步大幅度增高, 加入外源性 Ang-1 可以阻止 Tie-2 蛋白表达和磷酸化水平过度增高, 同时恢复血管低反应性, 提示休克晚期 Ang-2 通过 Tie-2 过度磷酸化来降低休克血管反应性。

基础研究表明, Ang-1、Ang-2 互为天然竞争性抑制物, 对 Tie-2 受体有不同的作用, Ang-1 可磷酸化并活化 Tie-2, Ang-2 可结合 Tie-2, 且亲和力与 Ang-1 结合 Tie-2 相当, 但不引起 Tie-2 的磷酸化和活化, 从而竞争性抑制 Ang-1 对 Tie-2 的活化; 而本实验发现在失血性休克晚期, 高表达的 Ang-2 也可以导致 Tie-2 的磷酸化。Bogdanovic 发现在人脐静脉内皮细胞, 低浓度($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 Ang-2 对 Tie-2 受体有抑制作用, 而高浓度 Ang-2 也可浓度依赖性的引起 Tie-2 受体、以及 PI3K、Akt 等下游分子的磷酸化和活化, 并在 Ang-2 浓度为 $800 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达峰值^[7]。提示 Ang-2 的浓度增高和作用时间延长可能是导致本实验中 Ang-2 磷酸化和活化 Tie-2 的重要原因。

本实验发现 Tie-2 介导了 Ang-1、Ang-2 调节大鼠失血性休克血管反应性双相变化的作用, 而 Tie-2 受体激活后又是通过怎样的信号途径调节休克血管反应性呢? 有研究发现, 在猪冠脉内皮细胞和人脐静脉内皮细胞, Ang-1($250 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)可引起 Tie-2 受体活化和 NO 持续释放, 5 min 内发生, 60 min 达高峰, 持续到 2 h^[8]; 在小鼠脚掌肌肉注射腺病毒重组 Ang-2($300 \text{ ng}\cdot\text{只}^{-1}$) 则可竞争性抑制 Ang-1 对 Tie-2 的活化及其对 NO 的调节^[9]。而 NO 对血管舒缩反应功能具有重要的调节作用^[10]。本实验研究发现, 缺氧早期 NO 含量显著增高, Ang2 和 Tie-2 抑制剂可抑制其增高; 缺氧晚期 NO 含量

增高得更为显著,并可被 Ang1 和 Tie-2 抑制剂显著抑制。因此 Tie-2 受体可能通过调节 NO 产生,介导 Ang-1、Ang-2 对休克血管反应性的调节作用。

REFERENCES

- [1] LIU L M, DUBICK M A. Hemorrhagic shock-induced vascular hyporeactivity in the rat: relationship to gene expression of nitric oxide synthase, endothelin-1, and select cytokines in corresponding organs [J]. J Surg Research, 2005, 125(2): 128-136.
- [2] XU J, LI T, YANG G M, et al. Differential expression of Ang-1 and Ang-2 proteins contributes to biphasic changes of vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2010, 26(9): 1684-1688.
- [3] BRINDLE N P, SAHARINEN P, ALITALO K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection [J]. Circ Res, 2006, 98(8): 1014-1023.
- [4] 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.
- [5] XU J, YANG G M, LI T, et al. Involvement of CPI-17 and ZIPK in the regulation of PKC α , ϵ on vascular calcium sensitivity following hemorrhagic shock [J]. Shock, 2010, 33(1): 49-55.
- [6] YANG G M, XU J, LI T, et al. Roles of V1a and V2 receptor in AVP restoring the hemorrhage-induced vascular hyporeactivity and calcium desensitization and its mechanisms [J]. J Surg Res, 2010, 161(2): 312-320.
- [7] BOGDANOVIC E, NGUYEN V P, DUMONT D J. Activation of Tie-2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization [J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 17): 3551-3560.
- [8] CHEN J X, LAWRENCE M L, CUNNINGHAM G, et al. HSP90 and Akt modulate Ang-1 induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium [J]. J Appl Physiol, 2004, 96(2): 612-620.
- [9] ROVIEZZO F, TSIGKOS S, KOTANIDOU A, et al. Angiopoietin-2 causes inflammation *in vivo* by promoting vascular leakage [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(2): 738-744.
- [10] PAN B X, ZHAO G L, HUANG X L, et al. Peroxynitrite induces arteriolar smooth muscle cells membrane hyperpolarization with arteriolar hyporeactivity in rats [J]. Life Sci, 2004, 74(10): 1199-1210.

收稿日期: 2012-07-25

栀子细粉醋糊外敷对大鼠血瘀模型的影响

汤佩佩, 白明, 尹俊涛, 苗明三^{*}(河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 探讨栀子细粉醋糊局部外用对大鼠血瘀模型的影响。方法 用砣码砸伤大鼠右后肢, 造大鼠血瘀模型。观察高、低剂量栀子细粉醋糊局部外敷对血瘀模型局部症状积分、血液流变学和局部病理变化的影响。结果 高、低剂量栀子细粉醋糊给血瘀模型大鼠局部外用, 使受伤右后肢周长显著减小, 明显减轻外伤血瘀症状, 明显改善血液流变学指标, 显著减轻外伤血瘀局部病理变化。结论 栀子细粉醋糊局部外用对大鼠血瘀模型有好的治疗作用。

关键词: 栀子细粉醋糊; 外用; 血瘀模型

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)04-0348-05

External Curative Effect of Gardenia Powder with Vinegar in Rat Model of Blood Stasis

TANG Peipei, BAI Ming, YIN Juntao, MIAO Mingsan^{*}(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the external curative effect of Gardenia powder vinegar paste in rat model of blood stasis. **METHODS** Rat model of blood stasis was established by weight in the right lower limb soft tissue of rats, and then treated with large and low-dose Gardenia powder vinegar paste. Symptom scores of damaged tissue, hemorheology and pathological changes were observed. **RESULTS** High and low-dose Gardenia powder vinegar paste could reduce significantly symptom scores of damaged tissue, significantly reduced the pain symptoms of sprain and obviously improved hemorheology, so Gardenia powder vinegar paste could significantly reduce pain in lesions sprain. **CONCLUSION** Gardenia powder vinegar paste has good local external curative effect on rat model of blood stasis.

KEY WORDS: Gardenia powder vinegar paste; external curative effect; rat model of blood stasis

基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目(2008BAI53B091)

作者简介: 汤佩佩, 女, 硕士, 助教 Tel: (0371)65962546

E-mail: tangpeipei@hactcm.edu.cn ^{*}通信作者: 苗明三, 男, 博士, 教授

Tel: (0371)65962546 E-mail: miaomingsan@163.com