DOI:10.16016/j.2097-0927.202304053

丙泊酚对脓毒症大鼠血管低反应性的改善作用及机制

孙 悦[1],张 杰[2],张濒丹[1],彭小勇[2],周远群[2],李 涛[2],刘良明[2],陈力勇[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心:麻醉科[1],战伤休克与输血研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 观察丙泊酚对脓毒症大鼠血管低反应性的改善作用及其机制。**方法** 96只12周龄的SD大鼠,雌雄不论,体质量200~220 g。采用随机数字表法分为假手术组(n=16)、脓毒症组(n=16)、丙泊酚组(n=16)、丙泊酚+ROCK抑制剂Y-27632组(n=16)、丙泊酚+PKCα抑制剂GO6976组(n=16)、丙泊酚+IP3抑制剂2-APB组(n=8)以及丙泊酚+细胞缝隙连接抑制剂甲氯灭酸钠(Movens)组(n=8),采用离体血管环张力测定技术和血管环钙敏感性测定技术,研究丙泊酚对脓毒症大鼠血管低反应性的改善作用及其与RhoA/ROCK、PKCα、IP3和细胞缝隙连接的关系。**结果** 离体血管环反应性测定实验和钙敏感性测定实验表明,与假手术组相比,脓毒症组大鼠血管对去甲肾上腺素的收缩反应性和钙敏感性均显著降低,量-效曲线右移,其中肠系膜上动脉降低最为明显,降低比例达51.42%(P<0.05);而丙泊酚组可明显改善脓毒症组血管低反应性以及钙敏感性,在股动脉的恢复作用最为显著,恢复比例达89.57%(P<0.05)。钙敏感性测定实验结果表明,与丙泊酚组相比,丙泊酚+Y-27632组和丙泊酚+GO6976组量-效曲线右移,Y-27632和GO6976可显著拮抗丙泊酚对严重脓毒症大鼠肠系膜上动脉主干血管钙敏感性的改善作用,抑制率分别为146.95%和88.63%(P<0.05)。离体血管环反应性测定实验显示,丙泊酚+Y-27632组和丙泊酚+Movens组可显著拮抗丙泊酚组对脓毒症组大鼠血管低反应性的改善作用,抑制程度分别为40.79%和169.90%(P<0.05);而丙泊酚+GO6976组和丙泊酚+2-APB组无明显变化。**结论** 丙泊酚治疗可显著改善脓毒症大鼠血管低反应性,其机制可能是通过RhoA/ROCK通路改善血管钙敏感性。

[**关键词**] 脓毒症;丙泊酚;血管低反应性;RhoA/ROCK;钙敏感性
[**中图法分类号**] R322.12;R631.1;R971.3 [**文献标志码**] A

Improved effect and mechanism of propofol on vascular hyporeactivity in septic rats

SUN Yue[1], ZHANG Jie[2], ZHANG Bindan[1], PENG Xiaoyong[2], ZHOU Yuanqun[2], LI Tao[2], LIU Liangming[2], CHEN Liyong[1] [1]Department of Anesthesiology, [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Department of War Wound Shock and Transfusion, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the improved effect of propofol on vascular hyporeactivity in septic rats and its underlying mechanism. **Methods** A total of 96 SD rats (12 weeks old, both genders, weighing 200~220 g) were randomly divided into sham group (n=16), sepsis group (n=16, cecal ligation and puncture), propofol group (n=16), propofol+ROCK inhibitor Y-27632 group (n=16), propofol+PKCα inhibitor GO6976 group (n=16), propofol+IP3 inhibitor 2-APB group (n=8) and propofol+gap junction inhibitor metoclopramide sodium (Movens) group (n=8). *In vitro* vascular ring reactivity and vascular calcium sensitivity were measured to observe the improved effects of propofol on vascular hyporeactivity in septic rats and its relationships with RhoA/ROCK, PKCα, IP3 and cell gap junction. **Results** Determination of *in vitro* vascular ring and calcium sensitivity showed that the contractile reactivity to norepinephrine (NE) and to calcium sensitivity were significantly decreased in the arterial rings isolated from

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81730059)
[**通信作者**] 陈力勇,E-mail:mzkcly@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the septic rats compared with those from the sham group, with the dose-response curve shifting to the right, and most significant decrease by 51.42% in the superior mesenteric artery (SMA, $P<0.05$). Propofol treatment significantly improved the hyporeactivity and calcium sensitivity of the vessels isolated from the septic rats, especially those of the femoral artery with a recovery rate of 89.57% ($P<0.05$). In comparison with the propofol group, the dose-response curves of the propofol+Y-27632 group and the propofol+GO6976 group were shifting to right, indicating that Y-27632 and GO6976 could significantly inhibit the amelioration of propofol on calcium sensitivity of SMA in severely septic rats with an inhibitory rate of 146.95% and 88.63% ($P<0.05$), respectively. Isolated vascular reactivity measurement demonstrated that Y-27632 and Movens treatment significantly antagonized the ameliorated role of propofol on hyporeactivity of blood vessels from the septic rats with an inhibitory rate of 40.79% and 169.90% ($P<0.05$), separately, while no such effect was observed in the propofol+GO6976 and propofol+2-APB groups. **Conclusion** Propofol treatment can significantly improve vascular hyporeactivity of septic rats, which may attribute to the increase of vascular calcium sensitivity through RhoA/ROCK pathway.

[**Key words**] sepsis; propofol; vascular hyporeactivity; RhoA/ROCK; calcium sensitivity

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81730059). Corresponding author: CHEN Liyong, E-mail: mzkcly@aliyun.com

脓毒症或脓毒性休克是临床常见危重症,病死率高达30%~70%[1]。血管低反应性是严重脓毒症主要的病理生理特征,指动脉血管对去甲肾上腺素等血管活性药物[2]的反应性降低或者不反应,是导致顽固性低血压,组织灌流不足,进一步发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),甚至死亡的重要原因。改善血管反应性对提高严重脓毒症患者的救治成功率、降低病死率至关重要[3]。前期针对血管低反应性发生机制进行的试验发现RhoA/ROCK[4]、PKCα[5]、ERK[6]等通道可调控钙敏感性,但临床上缺少改善脓毒症血管钙敏感性的治疗措施。

丙泊酚(2,6-二异丙基苯酚)是一种静脉注射γ-氨基丁酸激动剂类镇静药,具有易于滴定、起效快、消除迅速、药代动力学良好的优点,临床上广泛应用于重症监护患者的持续镇静[7]。除了其本身的镇静作用外,已有文献报道丙泊酚还可以纠正脓毒性休克大鼠的代谢性酸中毒以及减轻细胞因子反应,提高脓毒症患者的存活率[8]。而丙泊酚对脓毒性休克血管低反应性是否具有改善作用,尚不清楚。

据此,本研究采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)复制脓毒症大鼠模型,探讨丙泊酚对脓毒症血管低反应性的改善作用,同时观察RhoA/Rho激酶(RhoA/ROCK)、蛋白激酶Cα(PKCα)、三磷酸肌醇(IP3)以及细胞缝隙连接在其中的作用,为丙泊酚临床应用于改善脓毒症患者血管低反应性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与设备

离体器官灌流系统、八通道生理记录仪、微血管张力测定仪均购自澳大利亚AD Instrument公司。

1.2 药物与试剂

丙泊酚购自中国力邦制药公司,去甲肾上腺素(NE)购自中国远大医药公司,乙酰胆碱(Ach)购自中国生工生物公司:分别由复方氯化钠溶液稀释为1 mg/mL、10^{-2} mol/L、10^{-3} mol/L,分装后,丙泊酚保存于4 ℃,NE和Ach保存于-20 ℃。ROCK抑制剂Y-27632购自美国MedChemExpress公司,PKCα抑制剂GO6976购自美国Sigma-Aldrich公司,IP3抑制剂2-APB购自APExBIO公司,细胞缝隙连接抑制剂甲氯灭酸钠(Movens)购自美国InvivoChem公司:由双蒸水稀释为10^{-4}、10^{-4}、10^{-3}、10^{-2} mol/L,分装后保存于-20 ℃。K-H液配制(mmol/L):$NaCl_2$ 7、KCl 4.7、$NaHCO_3$ 25、KH_2PO_4 1.03、$MgSO_4$ 0.45、葡萄糖11.1、$CaCl_2$ 2.5,双蒸水定容,pH=7.4;高钾液配制(mmoL/L):KCl 120、$NaHCO_3$ 25、KH_2PO_4 1.03、$MgSO_4$ 0.45、葡萄糖11.1、$CaCl_2$ 2.5,双蒸水定容,pH=7.4;无钙K-H液配制(mmoL/L):$NaCl_2$ 7、KCl 120、$NaHCO_3$ 25、KH_2PO_4 1.03、$MgSO_4$ 0.45、葡萄糖11.1,双蒸水定容,pH=7.4;无钙高钾液配制(mmoL/L):KCl 120、$NaHCO_3$ 25、KH_2PO_4 1.03、$MgSO_4$ 0.45、葡萄糖11.1,双蒸水定容,pH=7.4。

1.3 实验动物、分组方案与脓毒症模型制备

SPF级SD大鼠(陆军特色医学中心实验动物中心)96只,雌雄不拘,体质量200~220 g,于实验前12 h禁食,可自由饮水。其中,24只大鼠按随机数字表法分为假手术组、脓毒症组和丙泊酚治疗组,每组8只,用于探索丙泊酚对脓毒症血管低反应性的作用。其次,40只大鼠采用随机数字表法分为假手术组、脓毒

症组、丙泊酚治疗组、丙泊酚+Y-27632 组以及丙泊酚+GO6976 组($n=8$),取肠系膜上动脉用于研究丙泊酚对脓毒症大鼠血管钙敏感性的作用及其与 RhoA/ROCK 和 PKCα 的关系。此外,32 只大鼠根据随机数字表法分为丙泊酚+Y-27632 组、丙泊酚+GO6976 组、丙泊酚+2-APB 组和丙泊酚+Movens 组($n=8$),取肠系膜上动脉用于探究丙泊酚改善脓毒症大鼠血管低反应性与 RhoA/ROCK、PKCα、IP3 以及细胞缝隙连接的关系。

脓毒症组取 SD 大鼠称体质量,按 45 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,腹部消毒,开腹后暴露盲肠,使粪便在盲肠末端压缩充盈,在距末端 0.6 cm 处用无菌 4 号细线结扎,采用三角锥贯穿已结扎的盲肠段的中央,随后将盲肠按照原来的位置送回腹腔,逐层缝合,放回笼中,自由饮水 15 h 后用于实验。丙泊酚组大鼠按照上述方法建立脓毒症模型后,腹腔注射 10 mg/kg 丙泊酚,12 h 后再次腹腔注射 10 mg/kg 丙泊酚,3 h 后用于实验。假手术组大鼠不进行盲肠结扎穿孔,其余操作同 1.3 一致。

各实验组大鼠麻醉固定后,做断颈处理,取胸主动脉(thoracic artery,TA)、肺动脉(lung artery,LA)、肠系膜上动脉主干(superior mesenteric artery,SMA)、股动脉(femoral artery,FA)、肾动脉(renal artery,RA)以及小动脉(肠系膜上动脉三级分支,small artery,SA),清除周围结缔组织,制成 2~3 mm 长血管环后用于血管收缩反应性和钙敏感性测定。

1.4 离体血管环反应性测定

将所取动脉血管环挂于注有 K-H 液的离体器官灌流系统的 37 ℃恒温浴槽中,持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体,给予预张力 0.5 g,每 0.5 h 更换 1 次 K-H 液,平衡 2 h 后加入高钾液诱导血管预收缩,待血管收缩达到平台期后更换为 K-H 液,再平衡 1 h,观察血管环对 NE 的收缩反应,血管环张力通过张力传感器连接至八通道生理记录仪记录。

血管环对 NE 的反应性用浓度累计(1×10^{-9}、1×10^{-8}、1×10^{-7}、1×10^{-6}、1×10^{-5}、1×10^{-4} mol/L)法测定,记录不同 NE 浓度下各血管环产生的最大收缩力。读取加高钾液前的基础张力值为 F1,高钾液刺激后血管环收缩达到平台期的张力值为 F2,加入 NE 前的基础张力值为 F1',不同 NE 浓度刺激后血管环收缩达到平台期的张力值为 F2',以(F2'-F1')/(F2-F1)×100%为量化标准,作量-效曲线,采用 Emax(血管收缩反应曲线最高点,即最大收缩反应性)以及量-效曲线评价血管对 NE 的收缩反应性。

根据血管内径的不同,本研究采用微血管张力记录仪测定肾动脉、股动脉和小动脉(肠系膜上动脉三级分支)的血管张力。分离肠系膜上动脉的三级分支动脉需将腹腔内肠道及其结缔组织一并取下后浸泡于 K-H 液中,在显微镜下采用眼科镊和眼科剪轻柔剥除三级分支血管周围结缔组织,剪取 2~3 mm 血管段。将所取肾动脉、股动脉以及小动脉血管环挂于注有 K-H 液的 37 ℃恒温离体器官灌流槽中,持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体,根据 Power Lab 软件的拟合曲线调节每个血管环最适宜的预张力,每 15 min 更换 1 次 K-H 液,平衡 1 h 后加入高钾液诱导血管预收缩,待血管收缩达到平台期后更换为 K-H 液,再平衡 0.5 h,观察血管环对 NE 的收缩反应,血管环张力通过张力传感器连接至微血管张力测定仪记录。不同部位血管收缩反应性的变化采用百分比反映,脓毒症后的变化程度=(正常组 Emax-脓毒症组 Emax)/正常组 Emax,丙泊酚处理后的变化程度=(丙泊酚组 Emax-脓毒症组 Emax)/(正常组 Emax-脓毒症组 Emax)。

丙泊酚+Y-27632 组、丙泊酚+GO6976 组、丙泊酚+2-APB 组和丙泊酚+Movens 组采用丙泊酚组大鼠 SMA 观察非钙依赖通路抑制剂、ROCK 抑制剂 Y-27632 以及 PKCα 抑制剂 GO6976、钙依赖通路抑制剂、IP3 抑制剂 2-APB 和细胞缝隙连接抑制剂 Movens 对丙泊酚改善严重脓毒症血管收缩反应性的作用,加入高钾液诱导血管预收缩,换用 K-H 液,直至收缩曲线达平衡后,分别采用终浓度为 10^{-6} mol/L 的 Y-27632、10^{-6} mol/L 的 GO6976、10^{-5} mol/L 的 2-APB 以及 10^{-4}mol/L 的 Movens 与血管环共孵育 20 min,其余操作同 1.4 一致。加入抑制剂后,血管环收缩反应性的变化采用百分比反映,变化程度=(丙泊酚组 Emax-丙泊酚+抑制剂组 Emax)/(丙泊酚组 Emax-脓毒症组 Emax)。

1.5 血管环钙敏感性测定

将所取 SMA 血管环挂于注有无钙 K-H 液的离体器官灌流槽的 25 ℃恒温浴槽中,持续充入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体,给予预张力 0.5 g,每 20 min 更换 1 次 K-HS,平衡 1 h,待张力曲线平稳后,换用无钙高钾液孵育 1 h,15 min 换液 1 次,待张力曲线平稳后,观察血管环对 Ca^{2+} 的收缩反应,血管环张力通过张力传感器连接至八通道生理记录仪记录。

血管环的钙敏感性用浓度累计法测定,使所用的 Ca^{2+} 终浓度分别为 3×10^{-5}、1×10^{-4}、3×10^{-4}、1×10^{-3}、2×10^{-3}、6×10^{-3}、1×10^{-2}、3×10^{-2}mol/L,记录不同 Ca^{2+} 浓度下血管环产生的最大收缩力,以张力/血管环质量(g/mg)为量化标准,作量-效曲线,采用 Emax 以及量-效曲线评价血管的钙敏感性。钙敏感性的变化采用百分比反映,脓毒症后的变化程度=(正常组 Emax-脓毒症组 Emax)/正常组 Emax,丙泊酚处理后的变化程度=(丙

泊酚组 Emax-脓毒症组 Emax)/(正常组 Emax-脓毒症组 Emax)。

采用丙泊酚+Y-27632 组和丙泊酚+GO6976 组观察 Y-27632 以及 GO6976 对丙泊酚改善严重脓毒症血管钙敏感性的影响,需分离取下丙泊酚治疗组大鼠 SMA,换用无钙高钾液,直至收缩曲线达平衡后,分别采用终浓度为 10^{-6} mol/L 的 Y-27632 和 10^{-6} mol/L 的 GO6976 与血管环共孵育 20 min,其余操作同 1.5 一致,观察血管环对 Ca^{2+} 的收缩反应性。加入抑制剂后,血管环收缩反应性的变化采用百分比反映,变化程度=(丙泊酚组 Emax-丙泊酚+抑制剂组 Emax)/(丙泊酚组 Emax-脓毒症组 Emax)。

1.6　统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间均数行单因素方差分析,加丙泊酚和各抑制剂前后均数行两样本 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

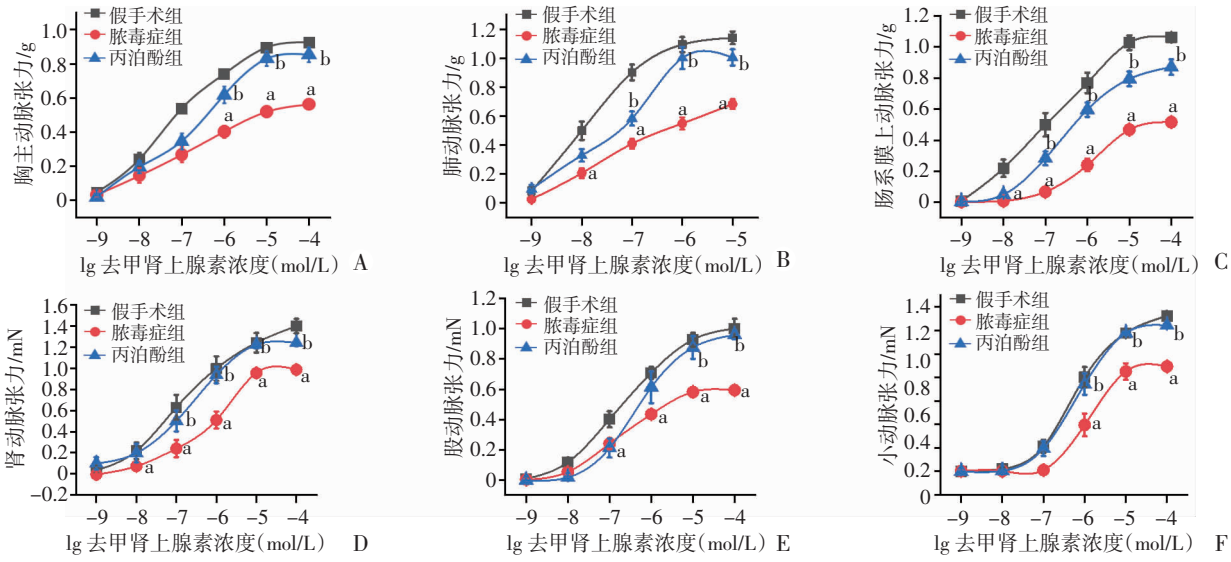
2.1　丙泊酚可显著改善脓毒症大鼠血管反应性

为初步观察丙泊酚对脓毒症血管低反应性的改善作用,实验分别取胸主动脉、肺动脉、肠系膜上动脉、股动脉、肾动脉以及小动脉进行研究。结果发现,与假手术组相比,脓毒症组大鼠所有血管的反应性均显著降低,表现为对去甲肾上腺素的量-效曲线均右移,Emax 显著降低(图 1)。不同部位血管的降低程度不同,其中肠系膜上动脉降低最为显著,幅度达 51.42%($P<0.05$),肾动脉降低幅度最小,仅 29.52%($P<0.05$),胸主动脉、肺动脉、股动脉以及小动脉的降低程度均在 30%~40%($P<0.05$)。给予丙泊酚可明显提高脓毒症大鼠血管对 NE 的收缩反应性,表现为各部位血管的量-效曲线均左移,Emax 显著增加(图 1),但不同部位血管的恢复程度不同,其中股动脉恢复程度最高,接近 90%($P<0.05$),胸主动脉和肠系膜上动脉三级分支恢复 80%以上($P<0.05$),肺动脉恢复 70%以上($P<0.05$),肠系膜上动脉和肾动脉恢复 60%以上($P<0.05$)。

2.2　丙泊酚对脓毒症血管钙敏感性的改善作用及其与 RhoA/ROCK、PKCα 的关系

由于脓毒症大鼠 SMA 对 NE 的血管反应性降低幅度最大(图 1),故本研究采用 SMA 观察丙泊酚对严重脓毒症血管钙敏感性的影响。实验结果发现,与假手术组相比,脓毒症组大鼠 SMA 对钙的敏感性呈降低趋势,表现为量-效曲线右移,Emax 降低 40.84%($P<0.05$)。丙泊酚处理后,SMA 的钙敏感性较脓毒症组显著增加,升高幅度达 60.95%($P<0.05$,图 2)。

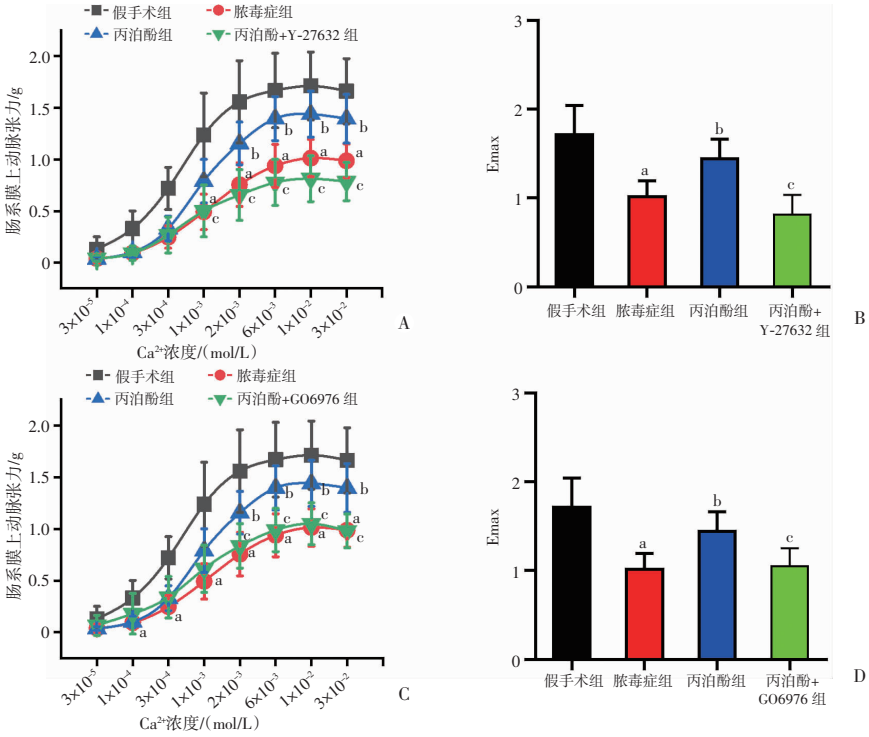
本研究进一步利用 ROCK 抑制剂 Y-27632 和 PKCα 抑制剂 GO6976 观察对丙泊酚治疗改善严重脓毒症大鼠血管钙敏感性的影响。结果表明,对比于丙泊酚组,丙泊酚+Y-27632 组的量-效曲线右移(图 2A),钙敏感性显著降低($P<0.05$,图 2B),降低幅度为 146.95%;丙泊酚+GO6976 组的钙敏感性也呈降低趋势(图 2C),降低幅度为 88.63%,与丙泊酚治疗组间差异有统计学意义($P<0.05$,图 2D)。结果提示,丙泊酚治疗改善严重脓毒症的血管低反应性可能与改善血管钙敏感性有关。



a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与脓毒症组比较

A~F:丙泊酚对脓毒症大鼠胸主动脉、肺动脉、肠系膜上动脉、肾动脉、股动脉以及肠系膜三级分支动脉收缩反应性的影响

图 1　丙泊酚对脓毒症大鼠血管收缩反应性的作用($n=8$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与脓毒症组比较;c:$P<0.01$,与丙泊酚组比较

A、C:Y-27632 和 GO6976 对丙泊酚增加脓毒症大鼠血管钙敏感性的影响;B、D:Y-27632 和 GO6976 对丙泊酚增加脓毒症大鼠血管最大钙敏感性(Emax)的影响

图 2 Y-27632 和 GO6976 对丙泊酚增加脓毒症大鼠血管钙敏感性的作用($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

2.3 PKCα、RhoA/ROCK、IP3 以及细胞缝隙连接在丙泊酚改善脓毒症血管低反应性中的作用

本研究利用 GO6976 和 Y-27632 观察非钙依赖信号通路 PKCα 或 RhoA/ROCK 是否与丙泊酚改善脓毒症血管低反应性有关。采用 GO6976 和 Y-27632 分别与离体 SMA 共孵育的研究结果表明,与丙泊酚组相比,丙泊酚+Y-27632 组收缩反应曲线明显右移,Y-27632 可显著抑制丙泊酚对脓毒症大鼠血管低反应性的改善作用,Emax 减低 40.79%($P<0.05$);而丙泊酚+GO6976 组虽收缩反应曲线左移,但 Emax 未表现出统计学差异(图 3A~D)。结果提示,丙泊酚改善脓毒症血管低反应性可能与通过 RhoA/ROCK 通路改善钙敏感性有关。

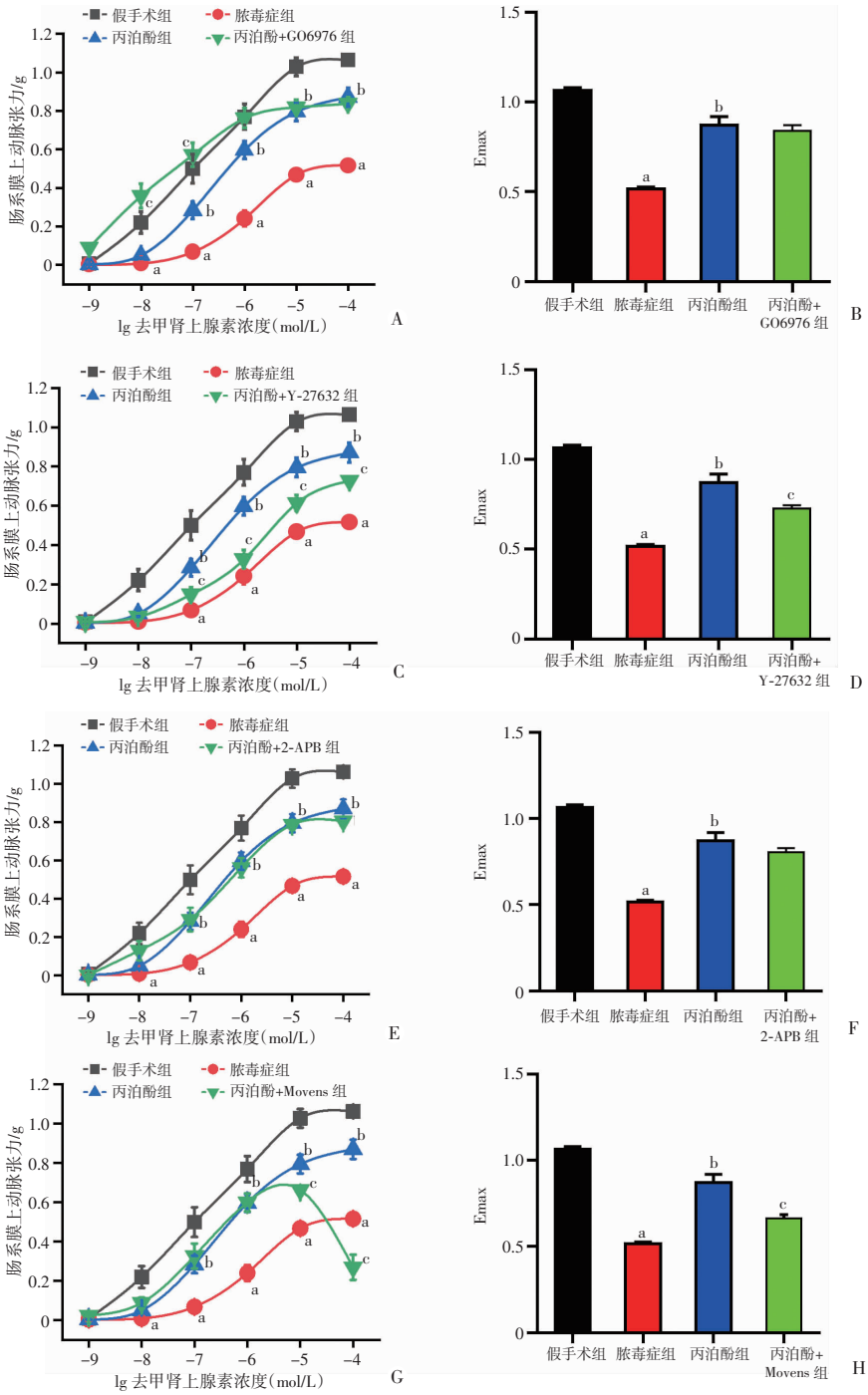
采用 IP3 抑制剂 2-APB 观察了 IP3 是否也参与丙泊酚改善脓毒症血管低反应性,结果发现,相较于丙泊酚组,丙泊酚+2-APB 组收缩反应曲线未见明显位移(图 3E),血管最大收缩反应性(Emax)未见显著改变(图 3F),2-APB 对丙泊酚改善脓毒症大鼠血管低反应性无显著改变作用。结果提示,丙泊酚改善脓毒症血管低反应性的作用可能与 IP3 无关。

采用细胞缝隙连接抑制剂 Movens 阻断血管细胞缝隙连接传递,验证丙泊酚对严重脓毒症血管低反应性的改善作用是否与细胞的缝隙连接有关。结果表明,与丙泊酚组相比,细胞缝隙连接抑制剂 Movens 作用于离体血管后,血管对低浓度(10^{-9}~10^{-6} mol/L)NE 的反应性无显著变化,而对较高浓度(10^{-5}~10^{-4} mol/L)NE 的反应性显著减低(图 3G),Emax 降低幅度达 169.90%($P<0.05$,图 3H)。表明在高浓度 NE 时,细胞间的缝隙连接可能参与丙泊酚对脓毒症血管收缩反应性的改善作用。

3 讨论

3.1 脓毒症大鼠血管低反应性在不同组织器官的差异及其相关因素分析

严重脓毒症或脓毒性休克是临床常见危重症。脓毒性休克存在血管低反应性,即血管对升压药物的反应降低或无反应,血管低反应性的存在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[9]。本研究发现,严重脓毒症大鼠各组织器官血管的反应性降低程度不同,其中肠系膜上动脉降低幅度最大,其次为股动脉,而肾动脉降低幅度最小。血管 α1 肾上腺素受体(α1-AR)表达水平的差异与血管对 NE 反应性的组织依赖性差异密切相关,α1-AR 分布越密集,对 NE 的反应性越敏感[10]。另外,动脉血管内皮和中层



a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与脓毒症组比较;c:$P<0.01$,与丙泊酚组比较

A、C、E、G:GO6976、Y-27632、2-APB 及 Movens 对丙泊酚改善脓毒症大鼠血管收缩反应性的影响;B、D、F、H:GO6976、Y-27632、2-APB、Movens 对丙泊酚改善脓毒症大鼠最大血管收缩反应性(Emax)的影响

图 3 GO6976、Y-27632、2-APB 及 Movens 对丙泊酚改善脓毒症大鼠血管收缩反应性的作用($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

平滑肌分布比例不同也与血管功能的差异有关,中层平滑肌纤维越多,对血压的调节越敏感。我们推测,肠系膜上动脉的 α1-AR 分布较少,平滑肌纤维较丰富,因此脓毒症时,血管对 NE 的反应性降低在肠系膜上动脉最为显著,可能与机体的重要器官功能保护而导致的血流重分布有关,而具体机制如何尚需进一步研究。

3.2 丙泊酚在改善脓毒症血管低反应性中的作用

丙泊酚在临床应用广泛,由于其突出的药代动力学优点,是重症监护病房最常用的镇静药物。近期已有文献报道丙泊酚可显著提高脓毒症的生存率[11],改

善脓毒症大鼠内皮功能障碍并减少血管超氧化物产生,同时对大鼠内毒素血症具有抗炎作用[12]。本研究结果表明,丙泊酚对严重脓毒症大鼠各部位的血管低反应性均有治疗作用,各器官恢复程度不同,其中尤以股动脉和小血管的恢复比例最大,而肾动脉的恢复比例最小,这可能有助于保证机体的血液供应,减轻脓毒症对器官功能造成的损伤。

3.3 丙泊酚通过 RhoA/ROCK 通路提高脓毒症大鼠血管钙敏感性,从而改善血管低反应性

RhoA 是小 G 蛋白 Rho 亚家族成员之一,同时,有研究表明,休克后血管平滑肌细胞钙失敏是血管低反应性发生的重要因素之一[13]。严重脓毒症时 SMA 血管环的钙敏感性显著减低,丙泊酚对严重脓毒症血管钙敏感性具有显著改善作用,而这种改善作用可被 ROCK 抑制剂 Y-27632 和 PKCα 抑制剂 GO6976 显著抑制。前期研究证实 RhoA/ROCK 通路参与调节休克血管低反应性。本研究发现,ROCK 抑制剂 Y-27632 可显著抑制丙泊酚治疗组大鼠的离体血管对 NE 的收缩反应性,而 IP3 抑制剂 2-APB 和 PKCα 拮抗剂 GO6976 不减低丙泊酚治疗组大鼠离体血管对 NE 的收缩反应性。这说明可能是 RhoA/ROCK 途径,而非 PKCα 或 IP3 途径,参与丙泊酚对严重脓毒症血管低反应性的改善作用。综上,PKCα 参与丙泊酚对严重脓毒症血管的钙敏感性调节,但并不参与丙泊酚治疗改善严重脓毒症血管对 NE 的反应性;而 RhoA/ROCK 不仅参与丙泊酚对严重脓毒症血管反应性的改善作用,还涉及丙泊酚对严重脓毒症血管钙敏感性的增加。小 GTP 酶 Rho 参与 Ca^{2+} 敏感性增强依赖性血管收缩[14],RhoA/ROCK 通过诱导肌球蛋白轻链(MLC20)磷酸化,调控血管收缩。因此,我们推测丙泊酚治疗可能通过调节钙敏感性改善严重脓毒症血管的低反应性,而这种钙敏感性调节机制偏向于非钙依赖的 RhoA/ROCK 通路,而不是钙依赖的 PKCα 通路。

3.4 细胞缝隙连接在丙泊酚改善脓毒症血管低反应性中的作用

另有研究表明,内皮细胞缝隙连接参与血管对血管活性药物反应的调节[15],内皮和平滑肌之间可通过缝隙连接进行物质交换,从而使缝隙连接间接控制血管张力[16]。在本实验中,缝隙连接抑制剂 Movens 可显著抑制丙泊酚对严重脓毒症血管低反应性的治疗作用,证明血管细胞缝隙连接可能也参与丙泊酚对严重脓毒症血管反应性的恢复作用的调节,但这种调节作用仅在较高浓度(10^{-5}~10^{-4} mol/L)NE 时最为显著。之前的研究结果表明,细胞间缝隙连接参与了休克后血管收缩反应的调节,而缝隙连接功能失活可使 ROCK 活性降低[17-18]。因此我们推测,细胞缝隙连接和 RhoA/ROCK 通路在不同浓度 NE 诱导血管收缩过程中具有协同作用。在 NE 浓度较低时,主要经 α1 肾上腺素受体激活 RhoA/ROCK 通路发挥促血管收缩作用,此时细胞缝隙连接作用不显著;NE 浓度较高时,主要通过细胞缝隙连接传递细胞间信号激活 RhoA/ROCK 通路促进血管收缩,但具体机制如何尚需进一步研究。

3.5 本研究存在的局限性

首先,NE 的正常生理浓度为 615~3 240 pmol/L,危重症患者的急救浓度为 5.9×10^{-3}~11.8×10^{-3} μmol/L,本研究中使用的 NE 终浓度为 10^{-3}~10 μmol/L,远远高于正常人和患者的血浆浓度,因此并不是临床急救用药浓度。在临床上,NE 用于回升血压,以维持患者的脑与冠状动脉血流灌注,此时血管的收缩幅度微小;而在本研究中,NE 主要用于诱导离体血管出现可被外置设备检测到的收缩幅度,这种收缩幅度出现在患者体内十分危险。尽管本实验室的前期研究证明该浓度梯度在离体血管环收缩反应性测定中是可行的[19-20],LIAO 等[21]、WILLIAMS 等[22]和 NGUYEN 等[23]也使用该浓度梯度进行了内毒素大鼠离体血管反应性的研究,但丙泊酚是否可改善脓毒症患者血管对临床急救浓度 NE 的反应性尚不可知。其次,本研究未深入探讨相关的作用机制,比如 RhoA/ROCK 和 PKCα 在丙泊酚改善脓毒症大鼠血管低反应性的作用中是否存在交互作用尚不清楚。再者是缺乏临床患者的应用数据支持,未能明确丙泊酚在临床脓毒症患者体内是否发挥改善血管低反应性的作用。因此接下来可以在较大动物体内验证本研究结果,同时探索细胞水平的分子机制,阐明丙泊酚改善脓毒症血管低反应性的具体机制,为在临床患者的应用提供支持性证据。

总之,本研究初步证实了丙泊酚可通过作用于非钙依赖的 RhoA/ROCK 通路调节钙敏感性,从而改善严重脓毒症大鼠的血管低反应性,恢复严重脓毒症大鼠器官组织的灌注。

参考文献:

[1] CHRISTAKI E, OPAL S M. Is the mortality rate for septic shock really decreasing? [J]. Curr Opin Crit Care, 2008, 14(5): 580-586. DOI: 10.1097/mcc.0b013e32830f1e25.

[2] GUARIDO K L, GONÇALVES R P M, JÚNIOR A G, *et al*. Increased activation of the Rho-A/Rho-kinase pathway in the renal vascular system is responsible for the enhanced reactivity to exogenous vasopressin in endotoxemic rats[J]. Crit Care Med, 2014, 42(6): e461-e471. DOI: 10.1097/ccm.0000000000000313.

[3] EVANS L, RHODES A, ALHAZZANI W, *et al*. Surviving

sepsis campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(11): 1181-1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y.

[4] LI T, LIU L M, XU J, *et al*. Changes of Rho kinase activity after hemorrhagic shock and its role in shock-induced biphasic response of vascular reactivity and calcium sensitivity[J]. Shock, 2006, 26(5): 504-509. DOI: 10.1097/01.shk.0000228796.41044.41.

[5] YANG G M, LI T, XU J, *et al*. PKC plays an important mediated effect in arginine vasopressin induced restoration of vascular responsiveness and calcium sensitization following hemorrhagic shock in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 628(1-3): 148-154. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.11.040.

[6] YANG G M, LI T, XU J, *et al*. Mitogen-activated protein kinases regulate vascular reactivity after hemorrhagic shock through myosin light chain phosphorylation pathway[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 74(4): 1033-1043. DOI: 10.1097/ta.0b013e31828586a2.

[7] DEVLIN J W, ROBERTS R J. Pharmacology of commonly used analgesics and sedatives in the ICU: benzodiazepines, propofol, and opioids[J]. Anesthesiol Clin, 2011, 29(4): 567-585. DOI: 10.1016/j.anclin.2011.09.001.

[8] MARLER J, MOHRIEN K, KIMMONS L A, *et al*. Effects of propofol on vasopressor use in patients with sepsis and severe sepsis: a pilot study[J]. J Crit Care, 2016, 35: 155-160. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.05.015.

[9] BOFFA J J, ARENDSHORST W J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 117-124. DOI: 10.1681/asn.2004060441.

[10] GERICKE A, MARTINKA P, NAZARENKO I, *et al*. Impact of α_1-adrenoceptor expression on contractile properties of vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293(3): R1215-R1221. DOI: 10.1152/ajpregu.00076.2007.

[11] BAO H G, LI S. Effects of propofol on the outcomes of rats with *Sepsis*[J]. J Surg Res, 2011, 168(1): e111-e115. DOI: 10.1016/j.jss.2010.12.034.

[12] TAKEMOTO Y. Dose effects of propofol on hemodynamic and cytokine responses to endotoxemia in rats[J]. J Anesth, 2005, 19(1): 40-44. DOI: 10.1007/s00540-004-0267-z.

[13] DUAN C Y, YANG G M, LI T, *et al*. Advances in vascular hyporeactivity after shock: the mechanisms and managements[J]. Shock, 2015, 44(6): 524-534. DOI: 10.1097/shk.0000000000000457.

[14] GONG M C, IIZUKA K, NIXON G, *et al*. Role of guanine nucleotide-binding proteins: ras-family or trimeric proteins or both: in Ca^{2+} sensitization of smooth muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1340-1345. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1340.

[15] KAMERITSCH P, POGODA K, RITTER A, *et al*. Gap junctional communication controls the overall endothelial calcium response to vasoactive agonists[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(3): 508-515. DOI: 10.1093/cvr/cvr345.

[16] POGODA K, KAMERITSCH P, MANNELL H, *et al*. Connexins in the control of vasomotor function[J]. Acta Physiol(Oxf), 2019, 225(1): e13108. DOI: 10.1111/apha.13108.

[17] MING J, LI T, ZHANG Y, *et al*. Regulatory effects of megj on vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008: 1. DOI: 10.1097/shk.0b013e31817d3ef2.

[18] XU J, LI T, YANG G M, *et al*. Pinacidil pretreatment improves vascular reactivity after shock through PKCα and PKCε in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59(6): 514-522. DOI: 10.1097/fjc.0b013e31824d4d75.

[19] YANG G M, PENG X Y, WU Y, *et al*. Involvement of connexin 43 phosphorylation and gap junctional communication between smooth muscle cells in vasopressin-induced ROCK-dependent vasoconstriction after hemorrhagic shock[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2017, 313(4): C362-C370. DOI: 10.1152/ajpcell.00258.2016.

[20] XU J, LIU L M. Role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity in hemorrhagic shock[J]. Chin Crit Care Med, 2005, 17(1): 20-23. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2005.01.008.

[21] LIAO M H, SHIH C C, TSAO C M, *et al*. RhoA/Rho-kinase and nitric oxide in vascular reactivity in rats with endotoxaemia[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56331. DOI: 10.1371/journal.pone.0056331.

[22] WILLIAMS J, BOGWU J, OYEKAN A. The role of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway in renal vascular reactivity in endothelial nitric oxide synthase null mice[J]. J Hypertens, 2006, 24(7): 1429-1436. DOI: 10.1097/01.hjh.0000234125.01638.3b.

[23] NGUYEN DINH CAT A, CALLERA G E, FRIEDERICH-PERSSON M, *et al*. Vascular dysfunction in obese diabetic db/db mice involves the interplay between aldosterone/mineralocorticoid receptor and Rho kinase signaling[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2952. DOI: 10.1038/s41598-018-21087-5.

(收稿:2023-04-12;修回:2023-06-05)

(编辑 刘秋池)